ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 10 Fascicule 3 1989



LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS

PUBLICATION TRIMESTRIELLE Septembre 1989

SOMMAIRE

CONTENTS

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 10 Fascicule 3 1989

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM



DIRECTEUR SCIENTIFIQUE : Madame J. NICOT
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts*, *Current Contents*, Publications bibliographiques du CDST (Pascal).



ÉLÉMENTS POUR UN INVENTAIRE MYCOLOGIQUE DES ENVIRONS DU SAUT PARARÉ (ARATAYE) ET DE L'INSELBERG DES NOURAGUES (GUYANE FRANÇAISE). I. INTRODUCTION. II. *HYGROPHORACEAE*

Régis COURTECUISSE

Laboratoire de Botanique et de Mycologie, Fac. de Pharmacie
rue du Prof. Laguesse, F-59045 Lille Cedex.

RÉSUMÉ - Après une présentation générale du secteur étudié dans le cadre d'une mission organisée par le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris en Guyane française, l'auteur décrit et figure les récoltes d' *Hygrophoraceae* qu'il y a effectuées. Quatre espèces sont présentées comme nouvelles: *Hygrocybe lilacinella*, *H. guyanensis*, *H. nouraguensis* et *H. cheilocystidiata*. Trois nouvelles combinaisons sont introduites: *Hygrocybe purpureofolia* (Bigelow) n.c., *H. troyana* (Murrill) n.c. et *H. mephitica* (Peck.) n.c.

ABSTRACT - After a general outline of the area studied during a mission organized by the Muséum d'Histoire Naturelle of Paris in French Guiana, the author describes and illustrates the collections of *Hygrophoraceae* he made there. Four species are proposed as new: *Hygrocybe lilacinella*, *H. guyanensis*, *H. nouraguensis* and *H. cheilocystidiata*. Three new combinations are introduced: *Hygrocybe purpureofolia* (Bigelow) n.c., *H. troyana* (Murrill) n.c. and *H. mephitica* (Peck) n.c.

MOTS CLÉS : Guyane Française, mycoflore, *Hygrophoraceae*, *Hygroaster*, *Hygrocybe*.

I. INTRODUCTION

A l'occasion d'une mission organisée par le Muséum National d'Histoire Naturelle en Guyane française, nous avons séjourné 4 semaines (du 13 février au 13 mars 1988) au coeur de la forêt guyanaise et y avons fait d'abondantes récoltes fongiques. Nous nous proposons, après une présentation de la région visitée et quelques généralités sur les récoltes effectuées, de décrire notre matériel, par groupe taxonomique, mais sans ordre systématique, au fur et à mesure de l'avancement du dépouillement et de la détermination des échantillons.

La Guyane Française et la forêt guyanaise

Le massif des Guyanes constitue une vaste entité phytogéographique et naturelle, couvrant environ un million de km². Cette entité regroupe non seulement les trois Guyanes (Guyana, ex Guyane britannique, Surinam, ancienne Guyane hollandaise et Guyane française), mais aussi une partie des territoires vénézuéliens et brésiliens qui leur sont limitrophes (Carte 1). Les limites en sont l'Orénoque à l'Ouest, l'Amazone et ses derniers affluents de la rive gauche au Sud et l'Atlantique au Nord et à l'Est.

Bien que certains auteurs englobent ce massif dans l'hylaea amazonienne, plusieurs particularités séparent le massif guyanais du bassin de l'Amazone. La forêt amazonienne se situe dans une vaste dépression horizontale alors que le massif guyanais repose sur un ancien bouclier primaire, le bouclier guyanais. Dans le bassin de l'Amazone, tous les cours d'eau convergent vers un fleuve géant, alors que dans le massif des Guyanes (au moins dans les trois Guyanes administratives), ils s'écoulent parallèlement vers l'Atlantique. La flore de la province guyanaise est particulière, très riche et à endémisme relativement élevé. Cela est dû à l'histoire de la région, au cours des temps géologiques. En effet, une mer épicontinentale précambrienne a séparé le bouclier guyanais du bouclier centro-brésilien, conférant alors au premier un caractère d'insularité (ce qui représente un facteur important d'endémisation bien que la grande ancienneté de ces événements permette d'en modérer l'importance); d'autre part, ce bouclier guyanais a constitué un refuge forestier lors des épisodes secs du Pléistocène et du post-Pléistocène.

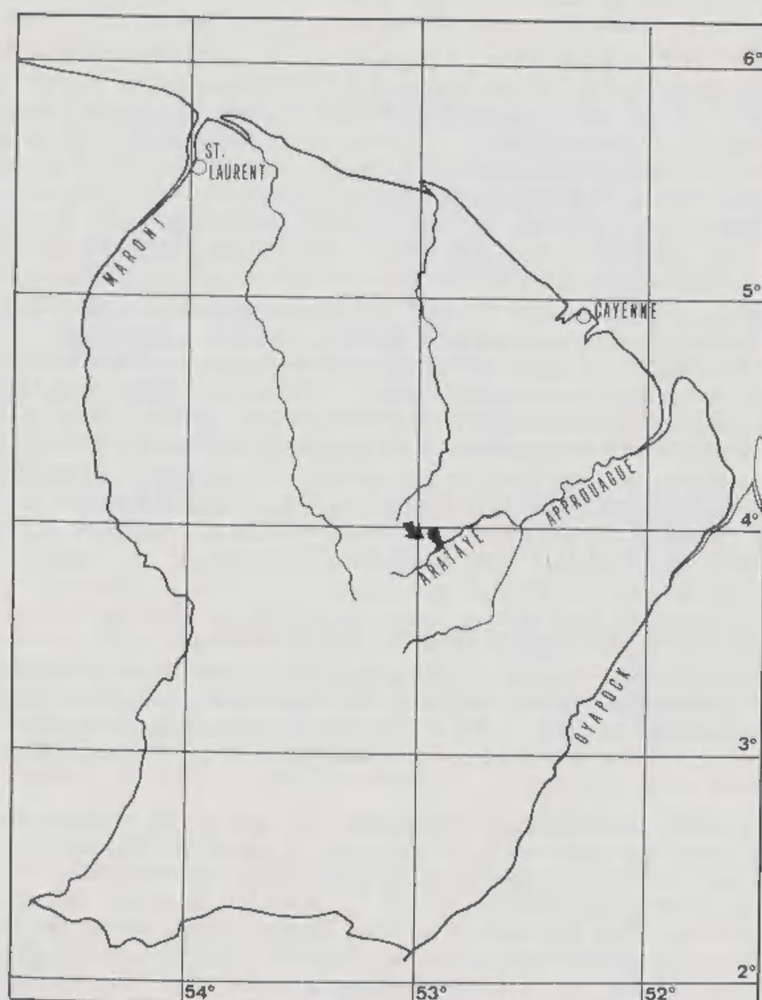
Actuellement le massif des Guyanes est couvert à 90% par la forêt dense. C'est une forêt tropicale humide, sempervirente de type amazonien, haute (40 à 50m, avec des émergents), multistrate, à frondaison constituant un recouvrement continu, à sous-bois peu fourni, sans tapis graminéen. Seulement 1 à 10% de la



Carte 1: situation du massif des Guyanes (ombré) et de la Guyane Française (flèche).

lumière solaire parviennent au niveau du sol. Les lianes ligneuses hautes et les épiphytes en constituent encore des éléments caractéristiques (Schnell, 1987).

La Guyane française, quant à elle, s'étend sur 91000km². Elle est couverte à 98% par la forêt dense. Ses limites naturelles sont l'Atlantique au Nord, le fleuve Maroni à l'Ouest, le fleuve Oyapock à l'Est, et la ligne de partage des eaux au Sud, cette dernière coïncidant avec la frontière brésilienne. Elle se situe entre 2 et 6° de latitude Nord et entre 52 et 55° de longitude Ouest. On estime qu'elle est



Carte 2 (d'après Oldemann, 1974: 76): situation de la région visitée (flèche): • Inselberg des Nouragues; * Saut Pararé sur l'Arataye.

riche d'environ 8000 espèces de plantes vasculaires dont au moins 500 espèces de grands arbres (De Granville, 1986). Cette diversité floristique fournit une grande variété de substrats pour les champignons. Le climat actuel est de type équatorial, humide et chaud, avec des précipitations moyennes variant de 2000 à 4000 mm/an, des températures moyennes proches de 27-28°C, et des saisons peu marquées, la saison sèche n'excédant pas 2 mois (Sept.-Oct.).

Le secteur de l'Arataye: l'inselberg des Nouragues et le Saut Pararé

Le caractère physiographique principal du département repose sur la succession régulière de collines séparées par d'innombrables criques et cours d'eau d'importance diverse, dont la monotonie est parfois interrompue par l'émergence d'inselbergs (promontoires granitiques isolés). On rencontre fréquemment ce type de formation dans le Sud et le Sud-Est du département et l'inselberg des Nouragues (carte 2) se trouve relativement isolé au sein de la forêt dense. Il se place dans un secteur auquel De Granville (1986) attribue une pluviométrie très élevée: de 3500 à 8000 mm/an. Le Saut Pararé, situé sur la rivière Arataye, affluent de l'Approuague, appartient au même district.

Notre séjour en forêt s'est déroulé en 2 étapes, la première de 9 jours, au camp des Nouragues, la seconde de 21 jours au camp du saut Pararé. Ces 2 bases, installées sur le terrain et entretenues par le Muséum National d'Histoire Naturelle, se situent approximativement à 100 km au Sud - Sud-Ouest de Cayenne (carte 2), et sont distantes l'une de l'autre d'environ 6km. Si la forêt est quasiment identique à proximité de ces 2 camps, la pluviométrie parait plus importante aux pied de l'inselberg des Nouragues qu'au niveau du Saut Pararé, et surtout plus régulière. En effet, pendant notre séjour, la "petite saison sèche" ou "petit été de Mars", ressentie sous la forme de 5 jours sans pluie le long de l'Arataye (du 27.2 au 3.3), fut inexistante aux Nouragues.

Généralités sur les récoltes fongiques effectuées

687 échantillons ont été récoltés durant notre séjour en forêt guyanaise; nous les avons décrits et desséchés sur place, les investigations microscopiques et les déterminations précises étant actuellement en cours. Quelques informations succinctes peuvent d'ores et déjà être données à propos de ces récoltes et de la flore mycologique du secteur visité.

Les groupes taxonomiques dominants sont, parmi les Ascomycètes, les Pyrénomycètes, spécialement les *Xylariaceae*, et parmi les Basidiomycètes les *Tricholomataceae*, en particulier les genres *Marasmius*, *Marasmiellus*, *Collybia* et *Hydropus*, et les *Agaricaceae*, surtout représentées par des membres des *Leucocoprineae* et des *Lepioteae*. Parmi les autres groupes, notons une certaine abondance d'Aphyllophorales (*Ganodermataceae*, *Polyporaceae* et affines, et *Corticiaceae* s.l.). Par contre, il faut souligner la rareté, voire l'absence (au moins en ce qui concerne les champignons rencontrés lors de notre bref séjour) de groupes tels que les *Amanitaceae* (4 échantillons), *Cortinariaceae* (4), *Russulaceae* (5), *Boletaceae* (0), ces familles renfermant bon nombre de taxons mycorrhiziques, effectifs ou potentiels. Ce phénomène est intéressant sur le plan

de la biologie des champignons de cette zone forestière, les saprophytes dominant très largement le spectre biologique. De plus, nous n'avons vu que très peu de parasites. Il faut toutefois remarquer que cette estimation est faite d'après les notes de terrain que nous avons réunies, la détermination précise des échantillons étant seulement amorcée et environ 8% de nos récoltes n'étant, pour le moment, attribuées à aucun groupe taxonomique précis.

Une autre caractéristique est la tendance très nette des espèces charnues (la majorité des Agaricales s.l. en particulier), à produire des carpophores solitaires. Bien que cela soit moins affirmé pour les espèces foliicoles ou ramulicoles, on est parfois gêné pour la description des échantillons récoltés et pour l'estimation de la variabilité intraspécifique.

D'autre part, le problème de la détermination des supports phanérogamiques s'est révélé très délicat. La plupart des branches mortes ou des feuilles tombées deviennent pratiquement anonymes dans cette région, où les espèces phanérogamiques sont encore seulement partiellement connues, et où leurs caractères spécifiques se trouvent souvent au-dessus de 30m de hauteur. Le mélange complexe des essences n'autorise jamais une extrapolation entre l'identité des arbres proches d'une récolte et celle des débris divers sur lesquels elle est effectuée. Enfin, la putréfaction, assez rapide pour bon nombre de bois, et l'activité très intense des termites ajoutent à la dégradation du matériel ligneux et à la difficulté d'identification des supports des récoltes. Malgré la présence d'un botaniste très expérimenté dans le domaine tropical (Dr. J.F. Villiers, M.N.H.N., Paris), on peut estimer que le substrat n'a été déterminé que pour seulement 20% de nos échantillons (au moins au niveau générique pour les supports phanérogamiques, ce pourcentage incluant les individus venant sur la terre nue).

Sur le plan écophysiologique, on peut émettre une autre remarque à la suite de ce séjour guyanais; les 5 jours "secs", sans la moindre pluie, vécus au camp de l'Arataye, ont été assez sévèrement ressentis à l'échelle fongique. En effet, un certain nombre des espèces d'Agaricales s.l., d'Hétérobasidiomycètes et de Discomycètes operculés, avaient complètement disparu au bout de 4 jours. Par contre, le surlendemain du retour de la pluie, la situation était redevenue quasiment normale. Pour confirmer l'influence, apparemment très rapide, des pluies sur les poussées fongiques, il serait intéressant de séjourner en forêt pendant une période chevauchant la saison sèche (Sept.-Oct.) et la saison humide. De nouvelles observations seraient également souhaitables pour confirmer l'impression selon laquelle cette période relativement sèche a été plus riche en *Hygrophoraceae*, "lépiotes s.l." et *Pluteaceae*.

II. HYGROPHORACEAE

Généralités

Seuls 2 membres de cette famille étaient connus en Guyane française. Heim (1967) a cité des récoltes de *Hygrocybe firma* (Berk. et Br.) Singer et de "*Hygrophorus (Hygrocybe) maroniensis*" Heim, effectuées près du Maroni, au Nord-Ouest du département. La seconde de ces espèces est de position

taxonomique douteuse. Si nous n'avons pas retrouvé ces 2 taxons, nous avons recueilli 16 échantillons appartenant à cette famille.

Il est remarquable de constater que 13 d'entre eux appartiennent à la section pantropicale *Firmae* Heinemann du genre *Hygrocybe*, caractérisée par un dimorphisme des basides et des spores. Cette section semble donc largement représentée en Guyane française (*H. firma*, cité par Heim en est le type). Les 3 autres récoltes se répartissent entre le genre *Hygroaster* (1 espèce) et d'autres sections du genre *Hygrocybe* (2 espèces).

Sept de ces récoltes appartiennent à des espèces connues: *Hygroaster nodulisporus* (Dennis) Singer (1 échantillon), *Hygrocybe hypohaemacta* (Corner) Pegler (1), *Hygrocybe occidentalis* (Dennis) Pegler (1), *Hygrocybe siparia* (Berk.) Singer (3), *Hygrocybe subflavida* (Murrill) Pegler (1). Quatre autres récoltes semblent proches de *H. occidentalis*, mais de légères différences, insuffisantes pour les individualiser, nous empêchent de les attribuer avec certitude à ce taxon. Un échantillon, appartenant vraisemblablement à une espèce non décrite, était malheureusement incomplètement mûr et, pour cette raison, ne peut être présenté comme nouveau. Par contre nous introduisons 4 espèces nouvelles, 3 d'entre elles appartenant à la section *Firmae*: elles sont nettement caractérisées et ne correspondent à aucun taxon connu: *Hygrocybe cheilocystidiata* Court. n.sp., *H. guyanensis* Court. n.sp., *H. lilacinella* Court. n. sp., *H. nouraguensis* Court. n. sp.

La proportion élevée d'espèces nouvelles proposées dans cette famille (25%) est confirmée et même amplifiée par celle rencontrée dans certains autres groupes taxonomiques (dépouillement en cours). Elle s'explique par le fait que la Guyane française n'a pas été explorée à grande échelle, sur le plan des Agaricales, depuis plus d'un siècle (rappelons que l'ouvrage "Cryptogamia Guyanensis" de C. Montagne, date de 1854). De plus, le secteur de l'Arataye, dans lequel nous nous trouvions, était rigoureusement vierge sur le plan des recherches mycologiques publiées. Enfin, on peut penser que l'endémisme phanérogamique du massif des Guyanes peut se retrouver au niveau du règne fongique, l'existence de nombreux taxons non décrits étant hautement prévisible dans cette zone.

Clé de détermination des espèces récoltées

1a - Spores grossièrement épineuses à verruqueuses. Pileus brun à noirâtre .... 1. *Hygroaster nodulisporus* (Dennis) Singer

1b - Spores absolument lisses. Basidiocarpes de couleurs vives 2

2a - (1b) Basides et spores d'un seul type bien que parfois assez variables dans une même préparation 3

2b - Basides et spores dimorphes (de deux types). *Hygrocybe sect. Firmae* 4

3a - (2a) Lames citrin pâle. Sp. 7-12 x 4,5-6,5 μm .... 2. *Hygrocybe subflavida* (Murrill) Pegler

3b - Lames à éclat bleu lilacin intense sur l'arête, mais à faces grises. Sp. 7-9,5-(10) x 2-5 μm .... 3. *Hygrocybe lilacinella* Courtec.

4a - (2b) Pileus et stipe visqueux 5

4b - Pileus et stipe secs ou plus ou moins lubrifiés 6

5a - (4a) Pileus rouge vif. Stipe rouge sous les lames, jaune en bas. Lames blanches. Ixocutis très développé au niveau du chapeau et du stipe..

.... 4. *Hygrocybe hypohaemacta* (Corner) Pegler

5b - Pileus petit, jaune à jaune-orangé. Stipe jaune, mais rouge vif juste sous les lames. Lames jaune d'oeuf. Pigment membranaire finement incrustant..................................... .... 5. *Hygrocybe guyanensis* Courtec.

6a - (4b) Lames blanches ou crème pâle, parfois faiblement colorées au fond des sinus. Cuticule très sèche. 7

6b - Lames franchement colorées, au moins jaune à jaune-orangé. Cuticule de type variable 8

7a - (6a) Lames arquées décurrentes. Cuticule finement squamuleuse. Stipe rouge ou orangé au sommet. Macrospores x 7-9-(10)μm. Trichoderme à hyphes plus ou moins couchées .... 11. *Hygrocybe nouraguensis* Courtec.

7b - Lames hautes, échancrées. Cuticule fortement veloutée à strigo-tomenteuse. Stipe jaune pâle à orangé pâle. Macrospores x 6-7,5μm. Trichoderme à hyphes dressées ... . 13. *Hygrocybe siparia* (Berk.) Singer

8a - (6b) Arête fertile ou cellules stériles peu évidentes 9

8b - Arête stérile ou présence de bouquets évidents de poils marginaux articulés 13

9a - (8a) Stipe creux à cortex mince. Pileus parfois perforé 10

9b - Stipe seulement fistuleux ou presque plein 12

10a - (9a) Pileus jusqu'à 5cm de diamètre, perforé, rouge-orangé.. .... 6. *Hygrocybe occidentalis* (Dennis) Pegler

10b - Pileus non perforé, souvent plus petit 11

11a - (10b) Macrospores étroites, 11-15-(16) x 6-8-(9)μm. Sous-hyménium subcelluleux. Stipe jaune-citrin pâle. Lames orange saumoné .... 10. *Hygrocybe* taxon 4

11b - Macrospores trapues, 10-12 x 6,5-9μm. Sous-hyménium filamenteux. Stipe fusoïde orangé et jaune. Lames à arête vermillon, jaune-orangé dans le fond .... 7. *Hygrocybe* taxon 1

12a - (9b) Pileus jaune-orangé pâle. Marge excédente. Lames saumon foncé à arête jaune. Chair blanchâtre au centre du chapeau .... 8. *Hygrocybe* taxon 2

12b - Pileus rouge-orangé. Marginelle jaune vif non excédente. Lames jaune-orangé à arête jaune pâle. Chair rouge-orangé vif au centre du chapeau.. .... 9. *Hygrocybe* taxon 3

13a - (8b) Lames décurrentes. Macrospores 14-17 x 7-8μm. Poils marginaux articulés 20-25 x 4-8 μm. Arête des lames jaune. Stipe jaune pâle en bas..................................... .... 14. *Hygrocybe* taxon 5

13b - Lames profondément échancrées. Macrospores 12-15 x 6,5-8,5μm. Poils marginaux articulés, 30-70 x 5-15μm. Couleur rouge-orangé vif presque uniforme .... 12. *Hygrocybe cheilocystidiata* Courtec.

Description des espèces

1. ***Hygroaster nodulisporus* (Dennis) Singer**, *Sydowia* 9: 370, 1955.
   = *Hygrophorus nodulisporus* Dennis, *Kew Bull.* 8: 259, 1953.
   = *Omphalina nodulispora* (Dennis) Kühner, *Bull. Soc. Linn. Lyon* 49: 418, 1980.

- Description macroscopique (Fig. 1): Pileus 28mm de diamètre, à centre profondément creusé en entonnoir, à dépression prolongée par une cavité caulinaire, à marge bossue. Couleur brun foncé à stries radiales noires. Marge

irrégulière, largement et obtusément dentelée. Cuticule plutôt mate, vaguement ruguleuse sous la loupe.
Lames très espacées hautes, relativement épaisses, avec lamelles et lamellules beaucoup plus basses, de forme très légèrement arquée à pentue, adnées, à arête entière, épaisse et concolore. Couleur blanchâtre.
Stipe 23 x 4-6mm, fragile, creux à caverneux, cylindracé bosselé, légèrement atténué vers le bas, gris assez foncé, plus pâle en bas, glabre et poli.
Chair bistre, lacuneuse, fragile et mince. Odeur nulle.

- Description microscopique: Spores (Fig. 2) 6-8 x 5-7 μm (sans les ornementations), grossièrement globuleuses ou courtement elliptiques, garnies de grosses épines ou verrues obtuses, parfois bifides, jusqu'à 2μm de haut (diamètre global jusqu'à 11μm); non amyloïdes.
Basides (Fig. 3) 4-sporiques, de grande taille, 45-60 x 2-14μm sans les stérigmates qui peuvent atteindre 13μm; cylindroclavées, à contenu plus ou moins nuageux à vacuolisé. Basidioles nombreuses.

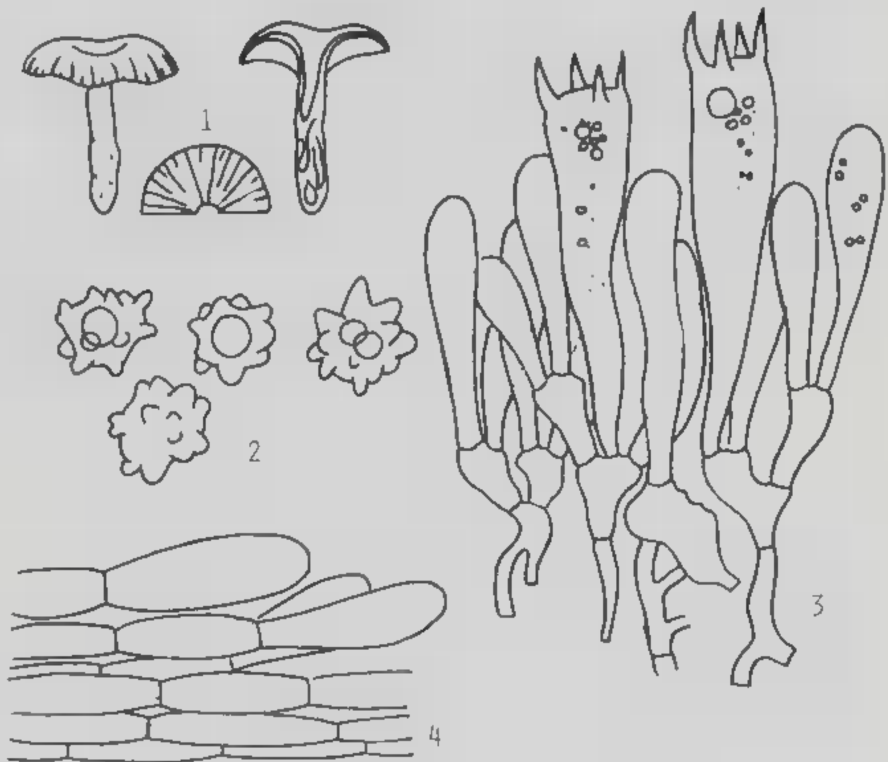


Fig. 1-4: *Hygroaster nodulisporus* (Dennis) Singer. 1: basidiocarpe, coupe et configuration de l'hyménophore; 2: spores; 3: basides, basidioles et sous-hyménium; 4: suprapellis.

Cystides nulles.
Sous-hyménium (Fig. 3) en pièces de puzzle assez grossières et larges. Trame plutôt régulière, subparallèle, légèrement divergente vers l'hyménium, à hyphes x 2-11μm. Laticifères non observés.
Pileipellis = cutis (Fig. 4) à éléments parallèles, assez courts, x 3-20μm, parfois vaguement redressés en surface. Gélification assez faible. Pigment sans doute membranaire lisse (?; nous n'avons pas retrouvé la pigmentation épimembranaire indiquée par Horak, 1968).
Boucles nulles.

- Récoltes: environs du Camp des Nouragues; sur humus dans la forêt dense; le 15.2.88; Leg.: RC et J.F. Villiers, Det.: RC, n° RC/GF88.043 (PC).

- Discussion: cette espèce semble assez variable macroscopiquement, quant à la taille et à la coloration des basidiocarpes. Nos exemplaires, plutôt foncés, semblent plus proches de la description originale, de Trinidad (Dennis, 1953), que de celle de Pegler (1983), effectuée d'après des spécimens antillais (Guadeloupe et Martinique). Les caractères microscopiques, quant à eux, sont très conformes. Connu seulement des 3 régions sus-citées, *Hygroaster nodulisporus* est nouveau pour la Guyane Française.

2. ***Hygrocybe subflavida*** **(Murrill) Pegler,** *Kew Bull. Add. Ser.* 9: 58, 1983.
= *Hydrocybe subflavida* Murrill, *Mycologia* 3: 197, 1911.
= *Hygrophorus subflavidus* (Murill) Murrill, *Mycologia* 4: 332, 1912.

- Description macroscopique (Fig. 5): Pileus 36mm de diamètre, étalé avec un mamelon central, sans doute conique dans la jeunesse, de couleur jaune d'oeuf avec des zones plus orangées et le centre blanchâtre. Marge lobée festonnée, un peu retroussée, à peine denticulée, plus ou moins fissile. Cuticule subglabre, à fibrilles apprimées. Disque plus ou moins tomento-fibrilleux, à fibrilles apprimées blanches.
Lames assez peu espacées, avec lamelles et lamellules de toutes tailles, hautes, ventrues, profondément échancrées sublibres. Arête entière, concolore. Couleur citrin pâle.
Stipe 52 x 5-6mm, un peu fistuleux fibreux, cylindracé à très vaguement fusiforme, jaune-citrin au sommet pâlissant à jaune d'oeuf pâle puis blanchâtre vers la base. Surface fibrilleuse.
Chair jaune-orangé sous la cuticule, grisâtre au centre du chapeau, blanchâtre à peine jaunâtre dans le stipe (seulement au sommet). Odeur nulle. Saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 6) 7-12 x 4,5-6,5μm, largement elliptiques à cylindracées subphaséolées, très polymorphes et de taille assez variable dans une même préparation.
Basides (Fig. 7) 30-50 x 2-11μm, 4-sporiques, clavées mais assez variables, certaines étant plus nettement stipitées ou capitées que d'autres.
Cystides nulles. Arête fertile.
Sous-hyménium finement emmêlé. Trame régulière à hyphes x 3-12μm, en fuseau ventru en profondeur, parfois subémergentes au niveau de l'hyménium (Fig. 8). Laticifères non observés.

Cuticule (Fig. 9): suprapellis en cutis à hyphes très grêles, régulières, x 3-10μm. Mediopellis à hyphes plus épaisses, banales. Pigment membranaire léger, très finement incrustant.
Boucles abondantes dans toutes les parties du basidiocarpe.

- Récoltes: environs du Saut Pararé (Arataye); sur terre nue en forêt dense humide; le 2.3.1988; Leg. et Det. RC, n° RC/GF88.437 (PC).

- Discussion: par sa trame régulière et son chapeau conique, cette espèce entre dans la section *Hygrocybe* du sous-genre *Hygrocybe*. Elle est de détermination aisée, et notre exemplaire correspond de manière satisfaisante aux descriptions récentes. Dans le domaine néotropical, elle est connue d'Antigua, de la Jamaïque, de la Martinique et de Trinidad (Pegler, 1983: 60). Elle est nouvelle pour la Guyane française. Hesler & Smith (1963: 119) en signalent une récolte

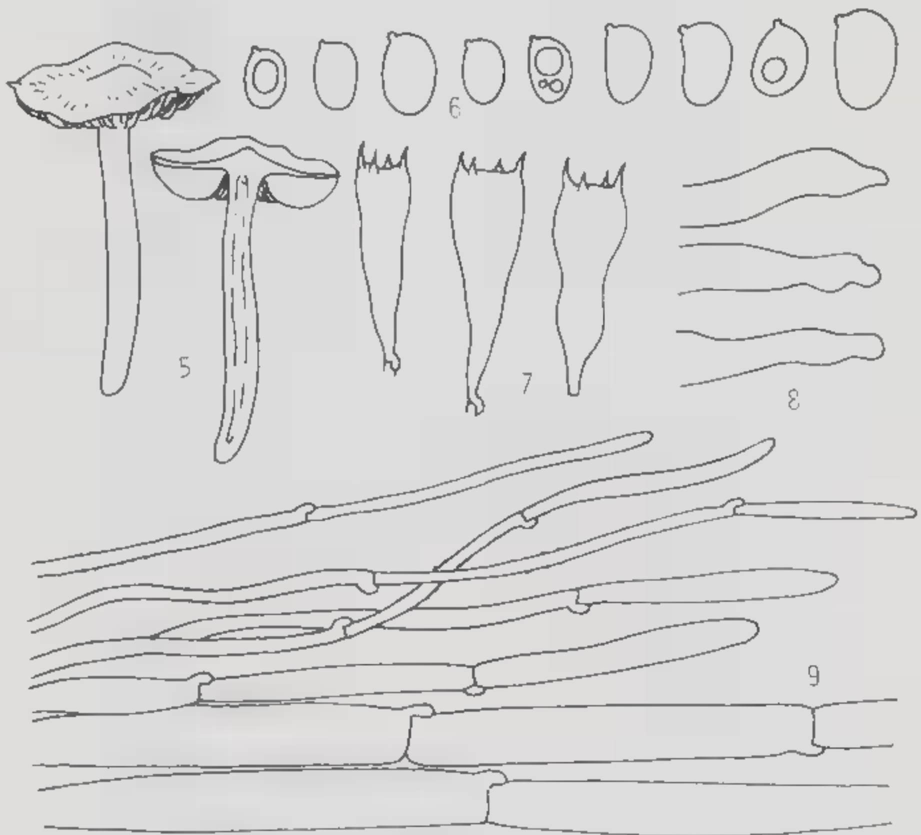


Fig. 5-9: *Hygrocybe subflavida* (Murrill) Pegler. 5: basidiocarpe et coupe; 6: spores; 7: basides; 8: hyphes tramaires émergentes; 9: suprapellis.

du Michigan aux USA. Celle-ci demanderait sans doute confirmation, étant donné l'éloignement des autres échantillons connus.

3. *Hygrocybe lilacinella* Courtec. *nov. sp.*

Species incertae sedis, probabiliter inscribenda in subgenus Pseudohygrocybe *sectio* Coccineae.

Pileus 12mm latus, conico-convexus, in umbone aurantiacus, in disco sordide ochraceo-luteus et margine luteolo. Cuticula glabra, radialiter crispula. Lamellae tenues, cum lamellis in sinu valde anastomosantibus, griseae sed acie fulgenter lilacino-caerulea, sinuatae subdecurrentes, omnes in unum stipitis halo aequaliter adnexae. Stipes 15 x 1,5-2mm, cylindro-fusiformis, ad apicem sordidulo-aurantiacus, infra luteus vel ad basim albescens, fistulosus, leviter in longitudinem rugulosus. Stipitis caro fere subalba.

Sporae 7-9,5-(10) x 3-5µm, cylindro-ellipticae, potius elongatae. Basidia 45-60 x 2-10µm, cylindro-clavata, 4-sporica. Cystidia nulla. Lamellarum acies fertilis. Sub-hymenium spissum. Trama subregularis, leviter prope hymenium divergens, gelificata in mediostrato. Cuticula subtrichodermica, hyphis x 2-10µm cum aliquot cellulis inflatis. Stipiticutis hyphis spissis vel difformibus. Fibulae adsunt, saepe sat crassae.

Typus: circa Nouragues montes (in Guyana Gallica) lectus, in terra nuda sub fruticibus in silva densa. 20.02.1988. Leg.: RC, n° RC/GF88.168 (PC).

- Description macroscopique (Fig. 10): Pileus 12mm de diamètre, conico-convexe, orangé au niveau du mamelon, ocre-jaune sale autour, plus jaunâtre à la marge qui est fine, un peu récurvée, entière à plus ou moins denticulée, un peu striée par transparence. Cuticule glabre, un peu brillante, ridulée radialement.
Lames basses à très basses, épaisses, avec lamelles fortement anastomosées crispées dans le fond, grises sur les faces, mais à éclat bleu-lilas intense sur l'arête, sinuées, subdécurrentes à adnées, arrivant toutes au même niveau sur un cerne du stipe, à arête irrégulièrement érodée.
Stipe 15 x 1,5-2mm, fistuleux, cylindro-fusiforme, orange terne en haut, jaune en bas, très pâle à blanchâtre à l'extrême base, nu, un peu ridulé en long.
Chair concolore en surface, mais presque blanchâtre dans le stipe. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 11) 7-9,5-(10) x 3-5µm cylindro-elliptiques, de silhouette assez variable, mais en règle générale, allongée.
Basides (Fig. 12) 45-60 x 2-10µm, cylindro-clavées assez allongées, 4-sporiques, à contenu vacuolisé. Basidioles nombreuses, cylindro-clavées.
Cystides nulles. Arête fertile.
Sous-hyménium (Fig. 12) épais à éléments cylindro-tortueux, plus ou moins ramifiés et bouclés. Trame plus ou moins régulière, un peu divergente vers l'hyménium, gélifiée congophobe en profondeur. Laticifères non observés.
Cuticule (Fig. 13) subtrichodermique avec une tendance vers le cutis banal par endroits à hyphes x 2-10µm et avec quelques éléments renflés, non gélifiée ou à peine. Pigment très discret, mais légèrement incrustant ponctué sur quelques hyphes.

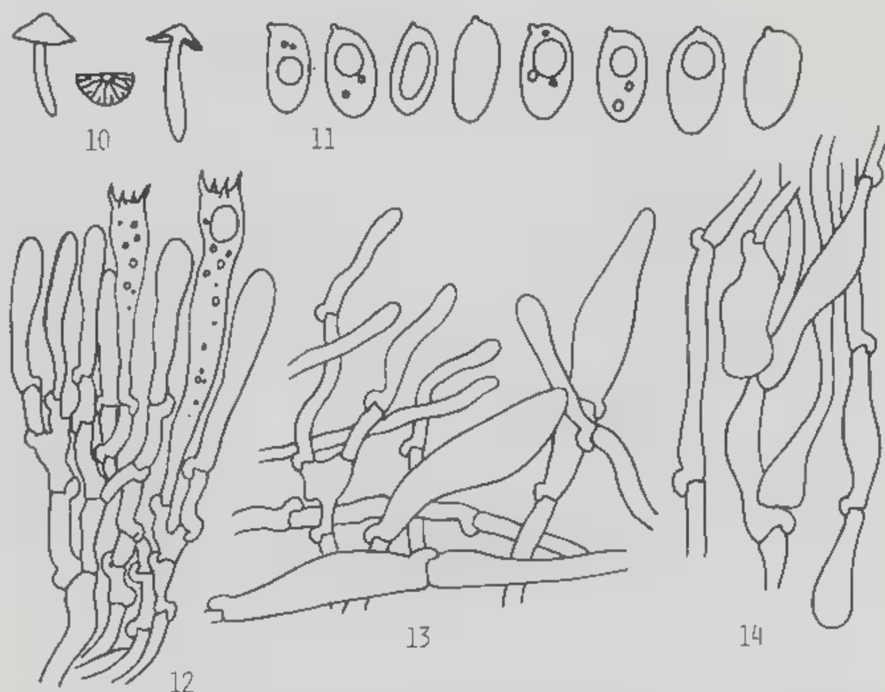


Fig. 10-14: *Hygrocybe lilacinella* Courtec. 10: basidiocarpe, coupe et configuration de l'hyménophore; 11: spores; 12: basides et sous-hyménium; 13: suprapellis; 14: revêtement du stipe.

Revêtement du stipe irrégulier, formé d'hyphes plus ou moins épaissies à difformes (Fig. 14) avec parfois des boucles énormes.
Boucles constantes et généralement assez volumineuses.

- Récolte: environs du Camp des Nouragues; sur terre presque nue, au pied d'un arbuste dans la forêt dense (1 seul exemplaire); le 20.2.88; Leg. et Det.: RC, n° RC/GF88.168 (PC).

- Discussion: cette espèce semble occuper une place à part dans le genre *Hygrocybe*. Par son aspect macroscopique, elle évoque la section *Hygrocybe*, mais sa trame à hyphes non très allongées ni fusiformes et légèrement divergentes vers l'hyménium, de même que sa cuticule sub-trichodermique, l'en éloignent très nettement. Sa place serait plutôt au sein du sous-genre *Pseudohygrocybe* Bon dans lequel on peut penser aux sections *Puniceae* Fayod ou *Coccineae* Fayod. Notre taxon semblerait plutôt proche des *Coccineae* par ses lames décurrentes, sa cuticule non gélifiée, sans que cette solution nous satisfasse entièrement. D'après Pegler (1983: 61), les *Puniceae* sont absents de la mycoflore des Petites Antilles, ce qui, sur le plan mycogéographique, pourrait apporter un argument supplémentaire en faveur des *Coccineae*.

La couleur des lames est un autre caractère remarquable de ce champignon. Les *Hygrocybe* à lamelles de teinte plus ou moins violacée sont très peu nombreux: on trouve dans la littérature *Hygrocybe purpureofolia* (Bigelow) Courtec. **nov. comb.** (Basionyme = *Hygrophorus purpureofolius* Bigelow in Bigelow & Barr, *Rhodora* 62: 190, 1960), *Hygrocybe troyana* (Murrill) Court. **nov. comb.** (Basionyme = *Hydrocybe troyana* Murrill, *Mycologia* 4: 332, 1911), *Hygrocybe mephitica* (Peck) Courtec. **nov. comb.** (Basionyme = *Hygrophorus mephiticus* Peck, *Bull. Torrey Bot. Club* 33: 213, 1906) et *Hygrocybe lilaceolamellata* (Stevenson) Horak. *H. purpureofolia* semble appartenir à la section *Coccinea* par ses hyphes cuticulaires fines peu gélifiées (Hesler & Smith, 1963: 143). Il se distingue de notre taxon par sa couleur plus brun rougeâtre dans la jeunesse, sa stature souvent plus robuste, ses lames hautes, ses spores plus longues et à silhouette moins étroite. Il a été décrit du Massachussets aux USA. *H. troyana*, de la Jamaïque et de Trinidad, est classé par Hesler & Smith (1963: 180) dans les *Coccinei*, cette coupure étant considérée au rang de "série" et regroupant des espèces très diverses *(Hygrotrama, Hygrocybe* sect. *Firmae* et sect. *Coccineae)*. C'est probablement dans cette dernière section qu'il doit également être placé. Il se distingue de *H. lilacinella* par ses couleurs plus ferrugineuses, ses lames hautes, par la rareté des boucles, voire leur absence au niveau des lames et par ses spores ellipsoïdes subétranglées. C'est sans doute l'espèce la plus proche de notre taxon guyanais. *H. mephitica* est originaire du Massachussets, sphagnicole, odorant et présente des lames gris-violacé à gris-pourpre, larges. Ses spores sont beaucoup plus grandes que celles mesurées sur nos échantillons. Enfin, *H. lilaceolamellata*, de Nouvelle-Zélande est une espèce moyenne au stipe trapu que son auteur (Stevenson, 1962: 378) a rangé dans le groupe de *H. tristis* (sect. *Tristes* Bat.). Sa stature, sa cuticule devenant cotonneuse, ses lames lilacines à teintes jaunes et ses spores plus grandes l'écartent de notre description de *H. lilacinella*.

Aucun de ces hygrophores ne correspond de manière satisfaisante à notre espèce, et nous la proposons donc comme nouvelle.

4. ***Hygrocybe hypohaemacta*** **(Corner) Pegler** in Pegler & Fiard *Kew Bull.* 32: 299, 1978.

= *Hygrophorus hypohaemactus* Corner, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 20: 180, 1936.

- Description macroscopique (Fig. 15): Pileus 10-20mm de diamètre, hémisphérique à irrégulièrement convexe, rouge vif avec une pastille plus sombre au disque, et à marginelle jaune, parfois décoloré en orange par places. Marge striée, irrégulière, denticulée à festonnée. Cuticule nettement visqueuse.
Lames épaisses, assez serrées avec lamellules, ventrues, ascendantes, sublibres, blanches. Arête irrégulière concolore.
Stipe visqueux, 20-30 x 2-3mm, à peine fistuleux, cylindracé à comprimé en long. Couleur rouge vif juste sous les lames, mais pâlissant vite en orange rougeâtre puis jaune, puis hyalin jaunâtre à la base.
Chair mince dans le chapeau, concolore aux surfaces. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 16) dimorphes. Macrospores 7-12 x 5-7μm, courtement elliptiques, parfois presque subglobuleuses, à contenu

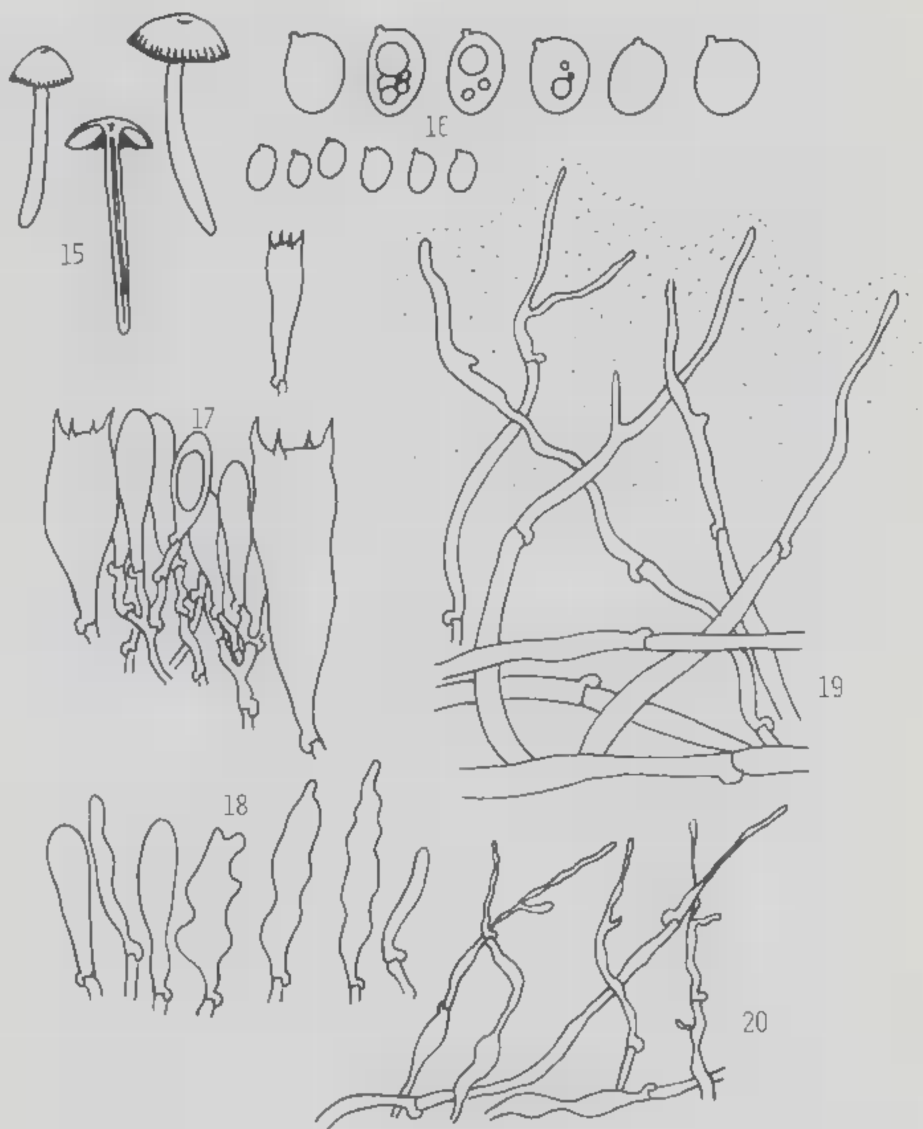


Fig. 15-20: *Hygrocybe hypohaemacta* (Corner) Pegler. 15: basidiocarpes et coupe; 16: macro- et microspores; 17: hyménium avec macro- et microbasides, dont une isolée; 18: poils marginaux; 19: suprapellis; 20: revêtement du stipe.

guttulé vacuolisé. Microspores 4,5-6,5 x 3,5-4μm plus ou moins courtement elliptiques, de silhouette plus étirée que les macrospores.
Basides (Fig. 17) 4-sporiques, dimorphes. Macrobasides 30-45 x 6-13μm, trapues, cylindro-clavées. Microbasides 18-22 x 2-4μm, légèrement clavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides peu différenciées, mais présence de cellules stériles clavées à difformes tortueuses (Fig. 18), jusqu'à 30 x 7μm.
Sous-hyménium (Fig. 17) filamenteux à hyphes fines x 1-3μm. Trame subrégulière à hyphes x 5-25-(30)μm.
Laticifères nombreux dans la trame des lames, jusqu'à x 15-(25)μm.
Cuticule (Fig. 19): suprapellis = ixocutis à hyphes fines x 2-5μm, engluées dans un mucus abondant. Mediopellis filamenteux à hyphes plus épaisses. Pigment non observé.
Caulocutis (Fig. 20) en ixocutis filamenteux, à hyphes tortueuses ramifiées noduleuses, moins gélifié que le pileipellis.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore.

- Récolte: environs du Saut Pararé (Arataye); humus et feuilles mortes dans la forêt dense, près d'une clairière artificielle; le 3.03.88; Leg. et Det. RC, n° RC GF88.465 (PC).

- Discussion: premier des *Hygrocybe* de la section *Firmae* que nous décrirons, ce champignon est bien connu dans la zone néotropicale grâce aux travaux de Pegler & Fiard (1978: 299), Pegler (1983: 66), Dennis (1970: 17) et il a été magnifiquement illustré par ces auteurs. L'espèce est nouvelle pour la Guyane française et a été signalée au Vénézuela et en Martinique. Elle se trouve également à Puerto Rico (D.J. Lodge, in litt.) et en Asie tropicale (Singapour). Hongo (1980: 150) a décrit du Japon une var. *boninensis* (Hongo) Hongo (1982: 91), qui diffère essentiellement du type, d'après son auteur, par ses lamelles colorées, rougeâtres à orangées et ses spores légèrement plus grandes. Pourtant, au vu des schémas des microspores, en partie franchement globuleuses et surtout de la cuticule, apparemment subtrichodermique à subpalissadique, il est possible que le taxon japonais soit distinct de *H. hypohaemacta*.

5. ***Hygrocybe guyanensis*** **Courtec.** ***nov. sp.***

Species sectionis Firmae, *cuticula viscosa, parva statura, colore luteo sed ad stipitis apicem vivide rubro, pigmentoque leviter incrustanti conspicua.*

Pileus 6mm latus, mediocriter convexus, hygrophanus, luteus, in centro pallide luteus, striis peridiscalisque corona luteo-aurantiis. Margo pilei tenuis, striatus. Cuticula glutinosa vel viscosa. Lamellae spissae, ventricosae vel sinuatae, ad marginem pilei acutae, emarginatae-adnatae, vitellinae. Stipes 14 x 1mm, glaber, viscosus, cylindraceus, ad basim pallide luteus, sursum luteo-aurantiaco-rubeolus et sub lamellis abrupto miniatus (H. subminutula *instar). Caro tenuis, in medio pileo luteo, alibi superficiebus concolor.*

Sporae dimorphae: macrosporae 12-14 x 7-8μm, ellipticae; microsporae 5,5-7 x 4-5μm, ellipticae, subphaseoliformes vel sublacrimiformes. Basidia 4-sporica, dimorpha: macrobasidia 38-45 x 5-14μm, late clavata; microbasidia 25-35 x 4-8μm, cylindro-clavata. Cystidia nulla, sec interdum adsunt pili marginales 15-20 x 2-4μm, cylindracei, sparsi. Subhymenium intricatum ± gelificatum. Trama subregularis, subgelificata, hyphis x 2-15μm. Laticiferi in stipite praesentes. Caro

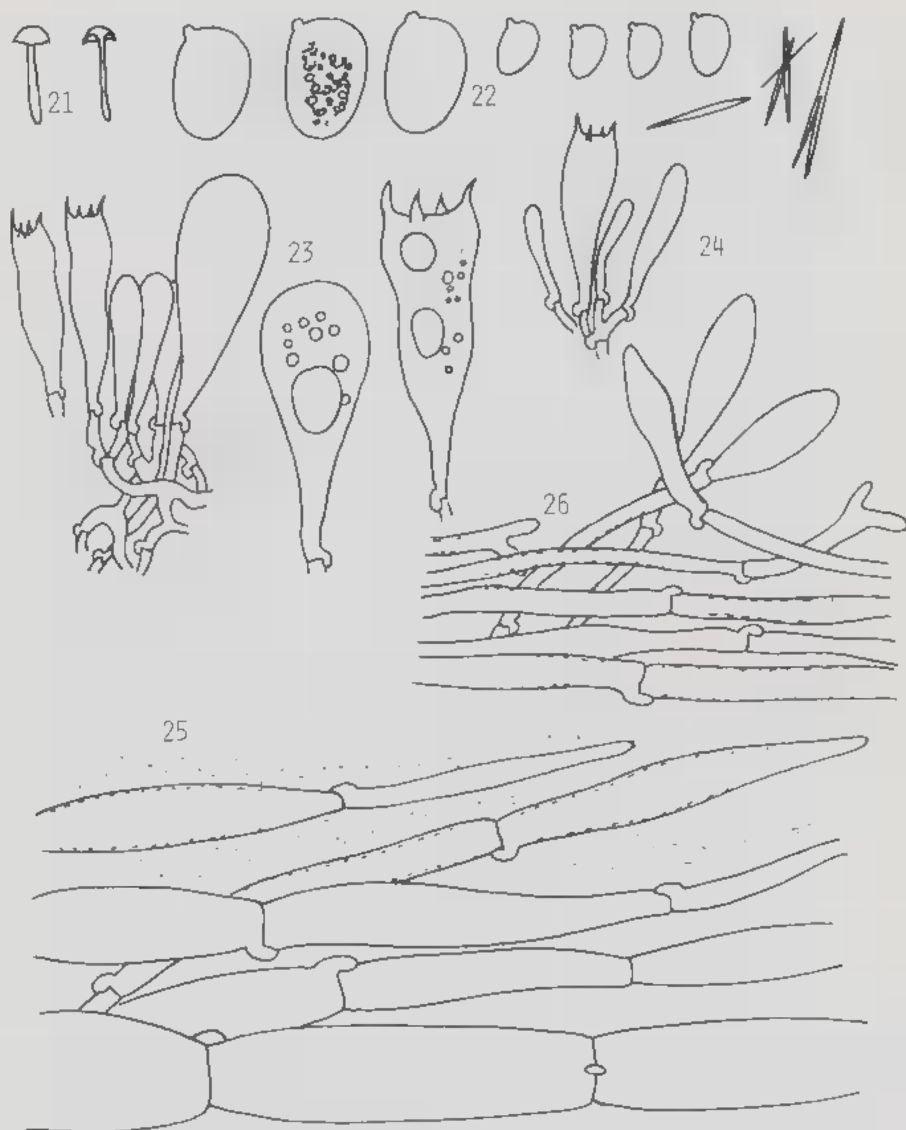


Fig. 21-26: *Hygrocybe guyanensis* Courtec. 21: basidiocarpe et coupe; 22: macro- et microspores; 23: aspect de l'hyménium avec deux macrobasides isolées; 24: microbaside et poils marginaux; 25: suprapellis; 26: revêtement du stipe.

vivide lutea s.l. Hymenium in Congo ammoniacali acicularia, sagitti- vel fusiformia crystalla generans. Epicutis gelificata, hyphis prostratis, eximiae

magnitudinis, usque ad 100 x 2-10µm (ut H. conica*). Pigmentum parietale subtilissime zebrino-incrustans, passimque laeve. Caulocutis hyphis superficialibus x 2-7µm, gelificatis. Fibulae numerosae adsunt.*

Typus: circa "Saut Pararé" (Arataye; in Guyana Gallica) lectus, in terra nuda, sub quadam radice in silva densa. 1.03.1988. Leg.: RC, n° RC/GF88.399 (PC).

- Description macroscopique (Fig. 21): Pileus 6mm de diamètre, bassement convexe, hygrophane, jaune à centre jaune pâle avec des stries et une couronne péridiscale jaune-orangé. Marge fine, entière striée. Cuticule collante à visqueuse, glabre avec quelques touches radiales plus pâles par hygrophanéité.
Lames épaisses, assez espacées avec des lamelles irrégulières, légèrement ventrues à sinuées, aigues en avant, échancrées-adnées, jaune d'oeuf, à arête entière, concolore.
Stipe 14 x 1mm, glabre, visqueux, cylindracé, jaune pâle en bas, jaune à orangé rougeâtre vers le sommet et brusquement rouge vermillon sous les lames ("effet *subminutula*"), nu.
Chair fine, jaune au centre du chapeau, concolore aux surfaces ailleurs. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 22) dimorphes: macrospores 12-14 x 7-8µm, elliptiques, à contenu nuageux guttulé; microspores 5,5-7 x 4-5µm, elliptiques subphaséolées à sublarmiformes.
Basides 4-sporiques (Fig. 23) dimorphes: macrobasides 38-45 x 5-14µm largement clavées, trapues à contenu vacuolisé; microbasides 25-35 x 4-8µm, cylindro-clavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles, mais présence au niveau de l'arête de petits poils cylindracés 15-20 x 2-4µm épars (Fig. 24).
Sous-hyménium (Fig. 23) emmêlé, plus ou moins gélifié. Trame subrégulière, subgélifiée, à hyphes x 2-15-(25)µm.
Laticifères nuls dans les lames ou très rares, présents dans le stipe.
Chair jaune vif sous le microscope dans les zones épaisses des préparations. Hyménium développant dans le congo ammoniacal des cristaux aciculaires, sagittés ou fusiformes.
Cuticule (Fig. 25): suprapellis gélifié à hyphes couchées de grande taille, jusqu'à 100 x 2-10µm, (évoquant le type cuticulaire du groupe *H. conica*). Mediopellis à hyphes plus courtes et plus épaisses, jusqu'à x 25µm. Pigment membranaire très finement incrustant zébrant et membranaire lisse par endroits.
Caulocutis (Fig. 26) à hyphes de surface x 2-7µm, plus ou moins dressées, peu gélifiées. Pigment membranaire incrustant zébrant très fin mais évident sur les hyphes sous-jacentes jusqu'à la base des poils. Chair caulinaire à hyphes parallèles, jaune vif sous le microscope.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore.

- Récoltes: environ du Saut Pararé (Arataye); terre nue sous une racine dans la forêt dense; le 1.03.88; Leg: RC, n°RC/GF88.399 (PC).

- Discussion: cette espèce, que nous pensions assez affine à *H. subminutula* (Murrill) Pegler, en raison du remarquable caractère "de terrain" commun (stipe rouge vif au sommet, contrastant avec la pâleur relative des lames), s'est révélée appartenir à la section *Firmae*. Si l'on admet que *H. hypohaemacta* var.

boninensis (Hongo) Hongo n'est pas spécifiquement distinct du type de cette espèce, il n'y a qu'un *Hygrocybe* de la section *Firmae* ayant les revêtements visqueux ou franchement glutineux, comme c'est le cas pour notre récolte.

Aucun autre taxon ne peut être assimilé à cette espèce dont les caractères remarquables sont: petite taille, couleur entièrement jaune, sauf au sommet du stipe, cuticule en ixocutis à hyphes de "type *conica*", à pigment membranaire incrustant léger, chair jaune vif sous le microscope, présence de cristaux se développant dans l'ammoniaque.

6. ***Hygrocybe occidentalis* (Dennis) Pegler** in Pegler & Fiard, *Kew Bull.* 32: 310, 1978.

= *Hygrophorus firmus* var. *occidentalis* Dennis, *Kew Bull.* 8: 267, 1953.

- Description macroscopique (Fig. 27): Pileus 50mm de diamètre, convexe, perforé au centre, rouge-orangé avec le disque plus jaune-orangé. Marge denticulée, fine, fissile. Cuticule ridulée radialement, striée plus ou moins cannelée et un peu flammée de rouge-orangé.
Lames épaisses espacées, avec lamelles et lamellules irrégulières, ventrues, hautes, émarginées assez profondément, saumon foncé (couleur évoquant celle des lames de *H. conicoides* (Orton) Orton et Watling) avec l'arête jaune-orangé, érodée-denticulée.
Stipe 90 x 8-12mm, entièrement creux, la cavité ouverte à la surface du chapeau, cylindracé, plus ou moins coudé en bas et pincé-comprimé vers le tiers inférieur. Base un peu cabossée. Couleur jaune assez foncé en haut, pâle à blanchâtre en bas. Surface mate, aspect un peu vitreux.
Chair orange dans le chapeau, jaune dans le stipe, plus pâle en bas. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 28) dimorphes: macrospores 10-12,5 x 7,9μm cylindro-elliptiques, parfois plus larges en avant, à contenu vacuolisé ou marbré; microspores 5,5-7,8 x 3,5-5μm courtement elliptico-amygdaliformes trapues, parfois sublarmiformes, d'abord optiquement vides puis un peu vacuolisées.
Basides 4-sporiques (Fig. 29) dimorphes. Macrobasides 40-55 x 3-10μm, trapues, clavées à contenu marbré réfringent; microbasides 30-35 x 2-8μm, élancées, optiquement vides.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles, mais présence de poils cylindracés ou clavés épars (Fig. 30), 25-40 x 3-8μm, bouclés.
Sous-hyménium (Fig. 29) formé de cellules allongées ramifiées. Trame parallèle à plus ou moins régulière, à hyphes jusqu'à x 25μm Laticifères présents dans la trame, jusqu'à x 5-8μm, plus abondants dans la cuticule.
Cuticule (Fig. 31): suprapellis en cutis banal, peu différencié à hyphes x 2-12μm. Subcutis à hyphes plus épaisses, jusqu'à x 25μm. Pigment intracellulaire.
Boucles parfois subansiformes (Fig. 29), abondantes dans les lames, plus rares dans la cuticule.

- Récolte: environs du camp des Nouragues; sur humus dans la forêt dense; le 15.02.88; Leg. et Det.: RC, n° RC/GF88.045 (PC).

- Discussion: cette récolte correspond de manière très satisfaisante au concept d' *H. occidentalis* détaillé par Pegler & Fiard (1978: 310) puis par Pegler (1983:

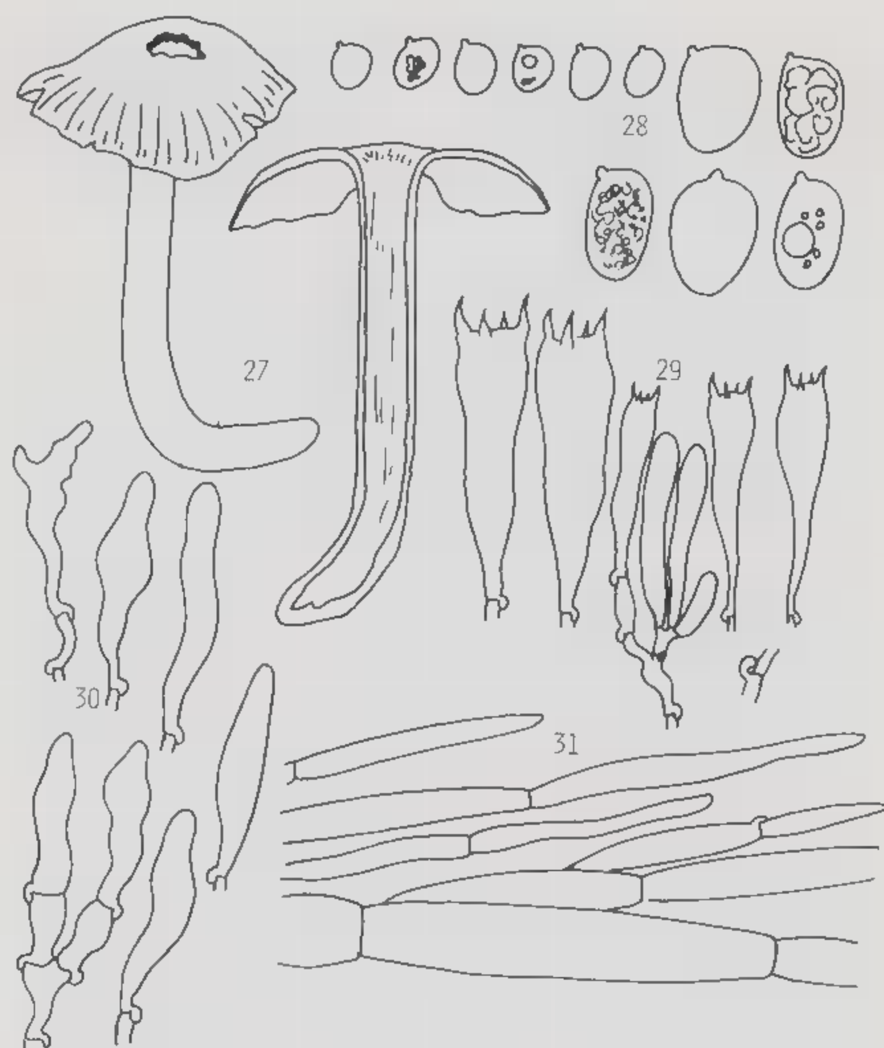


Fig. 27-31: *Hygrocybe occidentalis* (Dennis) Pegler. 27: basidiocarpe et coupe; 28: macro- et microspores; 29: macro- et microbasides; 30: poils marginaux; 31: suprapellis.

76). Le chapeau perforé, les lames vivement colorées et la chair un peu vitreuse aqueuse sont très caractéristiques. Ce taxon, signalé de Trinidad, Dominica, de la Martinique et de la Guadeloupe, et présent à Puerto Rico (D.J. Lodge, in litt.) est nouveau pour la mycoflore de Guyane française.

Si la description ci-dessus est conforme à la "tradition" de *H. occidentalis*, nous avons également effectué 4 récoltes qui s'en approchent par certains caractères, mais s'en éloignent par d'autres, sans toutefois en être suffisamment distinctes, à notre avis, pour justifier leur séparation sur le plan taxonomique. Nous donnons donc les descriptions de ces 4 numéros, sans leur attribuer de nom pour le moment, en espérant que leur statut pourra être précisé dans l'avenir.

7. ***Hygrocybe*** **taxon 1 (ad *H. occidentalis*)**

- Description macroscopique (Fig. 32): Pileus 32mm de diamètre, bassement déprimé au centre avec la marge bossue, flammé de vermillon, d'orange et de jaune. Marge fine, entière mais fissile. Cuticule fibrilleuse.
Lames très espacées avec lamelles, ventrues, subdécurrentes, rouge sang à vermillon vers l'arête et jaune orangé dans le fond, à arête denticulée plus jaunâtre.
Stipe 35 x 3-7mm, creux mais non perforé au sommet, un peu fusoïde, pincé sous les lames, orange jaunâtre en haut puis jaune, puis pâle à blanchâtre ou grisâtre à la base, nu.
Chair concolore aux surfaces, blanchâtre dans le stipe.
Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 33) dimorphes: macrospores 10-12 x 6,5-9μm, elliptiques à face ventrale souvent plus plane; microspores peu mûres (cf. discussion plus bas), environ 7 x 5μm, courtement elliptiques à subglobuleuses.
Basides 4-sporiques (Fig. 34) dimorphes: macrobasides 50-60 x 2-12μm, largement clavées à subcapitées, à grosses vacuoles dès la jeunesse; microbasides 35-45-(50) x 2-4-(8)μm, peu mûres.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles, mais présence de quelques poils cylindracés (Fig. 35) jusqu'à 40 x 4μm, cylindro-tortueux épars.
Sous-hyménium (Fig. 34) emmêlé à cellules tortueuses, quelques-unes renflées irrégulièrement. Trame un peu gélifiée et jaune sous le microscope, plus ou moins régulière à hyphes fusiformes très longues jusqu'à 150 x 25μm. Laticifères présents.
Cuticule (Fig. 36): suprapellis en cutis peu différencié à hyphes longues, atténuées vers les extrémités. Mediopellis à hyphes jusque x 25μm. Pigment non observé.

Boucles abondantes, surtout dans la trame et l'hyménium, plus rares dans la cuticule, fréquemment subansiformes (Fig. 34).

- Récolte: environ du Saut Pararé (Arataye); au bord du saut Pararé, dans l'humus, en forêt dense; le 24.02.88; Leg.:RC, n° RC/GF88.230 (PC).

- Discussion: cette récolte se rapproche de *H. occidentalis* en ce sens que c'est la seule espèce compatible dans les clés des *Firmae* disponibles (Pegler & Fiard, 1978; Pegler, 1983). Pourtant, elle semble en différer légèrement par divers caractères: stipe non perforé, lames nettement discolores, bordées de rouge, trame gélifiée et sous-hyménium remarquable.

De plus, ce champignon nous donne une première occasion de remarquer que la maturation des spores, chez les *Hygrocybe* de la section *Firmae* semble diachronique, entre les micro- et les macrospores, ces dernières atteignant leur

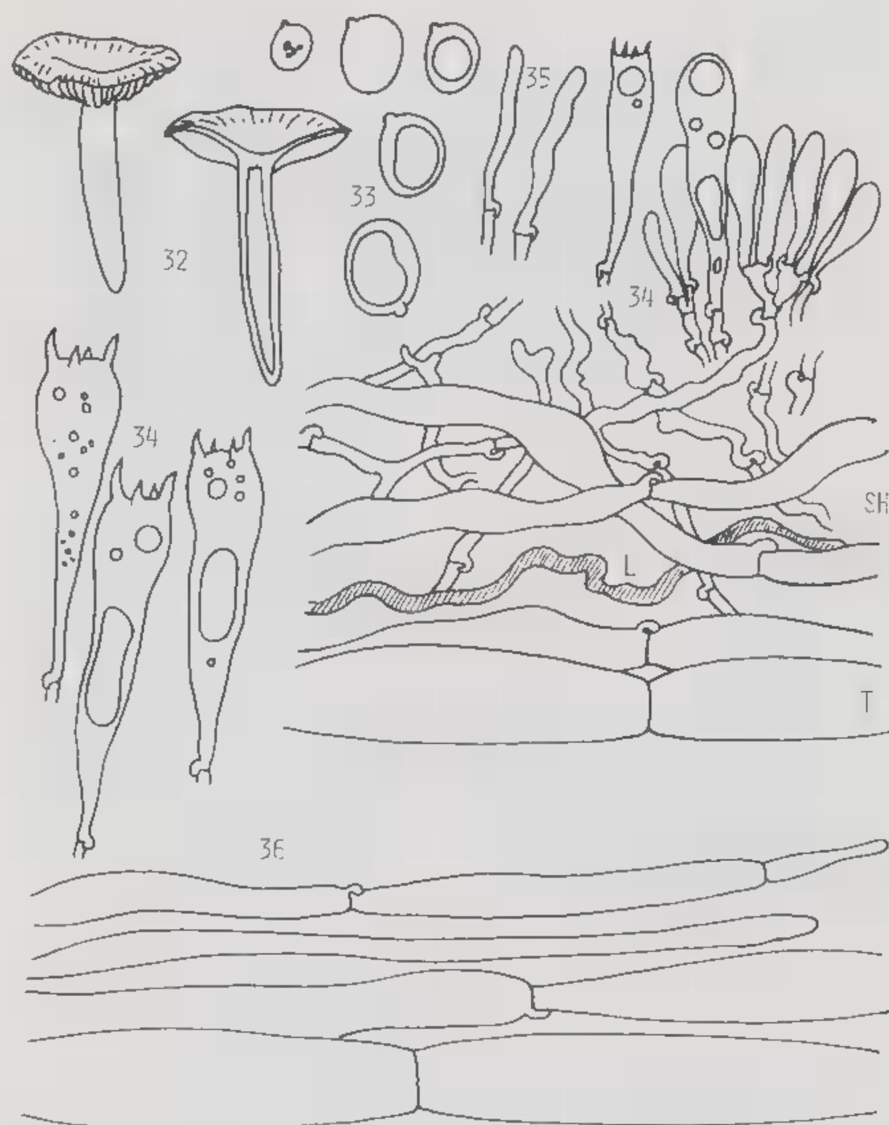


Fig. 32-36: *Hygrocybe* taxon 1. 32: basidiocarpe et coupe; 33: macro et microspores; 34: macrobasides, microbaside et aspect du sous-hyménium (SH) et de la trame (T) avec un laticifère (L); 35: poils marginaux; 36: suprapellis.

maturité avant les microspores. Nous aurons de nouveau l'opportunité, plus loin, de souligner ce phénomène. Pourtant, Dennis (1961: 68) signale (pour *H.*

hypohaemacta) que, dans une sporée, la proportion de micro- et de macrospores est identique.

8. *Hygrocybe* taxon 2 (ad *H. occidentalis*)

- Description macroscopique (Fig. 37): Pileus 18mm de diamètre, bassement convexe à marge plus ou moins rabattue, orange terne à stries jaune-orange, et centre jaunâtre; marge fine, excédente, rabattue verticalement, plus ou moins dentée-appendiculée, striolée; cuticule fibrillo-soyeuse radialement.
Lames épaisses et espacées, ventrues, très largement échancrées, adnées avec une dent de décurrence, saumon-rougeâtre foncé (vers *H. conicoides*), à arête jaunâtre épaisse un peu ondulée.
Stipe 43 x 2,5-3mm, fistuleux, mais non creux, cylindracé, jaune d'oeuf en haut, puis plus pâle, et enfin citrin verdâtre à la base, à peine pruineux en haut et glabre, poli ailleurs.
Chair blanchâtre au centre du chapeau et du stipe, concolore aux surfaces ailleurs.
Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 38) dimorphes: macrospores 12-14,5 x (6)-7-8μm, cylindro-elliptiques, parfois subphaséolées ou subétranglées, parfois plus large en avant, à contenu plus ou moins vacuolisé; microspores 5-7 x 4-5μm d'abord subglobuleuses puis elliptiques, optiquement vides puis parfois avec une vacuole.
Basides 4-sporiques (Fig. 39) dimorphes: macrobasides 40-50 x 3-12μm, trapues, largement clavées avec de grosses vacuoles; microbasides 25-35 x 2-5μm, cylindro-clavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles et poils marginaux non observés; arête moins différenciée que chez les deux numéros précédents.
Sous-hyménium (Fig. 39) plutôt emmêlé, à articles assez courts. Trame subrégulière, à hyphes jusque x 20μm, jaune sous le microscope, assez dense et congophobe. Laticifères présents.
Présence, au niveau de l'hyménium, d'une matière amorphe en guttules réfringentes qui empatent les basides et gênent l'observation.
Cuticule (Fig. 40): suprapellis filamenteux peu différencié, à hyphes x 3-8μm. Mediopellis à hyphes plus trapues, jusque x 50μm.
Boucles présentes, plus abondantes dans l'hyménium, normales (pas de tendance ansiforme).

- Récolte: environs du Saut Pararé (Arataye); parcelle Muséum n°5 dans un humus mêlé à du bois en décomposition; le 27.02.88; Leg.: RC, n° RC/GF88.349 (PC).

- Discussion: les clés des *Firmae* nous mènent à nouveau à proximité de *H. occidentalis*, mais l'échantillon décrit ci-dessus semble tout à fait aberrant par rapport au type, par de nombreux caractères macroscopiques (stature gracile, stipe non creux mais à peine fistuleux, couleur pâle, marge excédente). Il diffère également du précédent par la nature de son sous-hyménium, ses macrospores plus grandes, son arête fertile, la présence d'une matière hyméniale amorphe. De nouvelles récoltes seront nécessaires pour préciser son originalité.



Fig. 37-40: *Hygrocybe* taxon 2. 37: basidiocarpe et coupe; 38: macro- et microspores; 39: macro-, microbasides et sous-hyménium; 40: suprapellis.

9. *Hygrocybe* taxon 3 (ad *H. occidentalis*)

- Description macroscopique (Fig. 41): Pileus 22mm de diamètre, presque plat à vague dépression discale et marge bossue, rouge-orangé à fibrilles innées plus jaunes; marge irrégulière, marginelle jaune vif; cuticule un peu collante, fibrilleuse radialement.

Lames assez fines, moyennement espacées avec lamelles et lamellules irrégulières, ventrues, largement échancrées avec une dent de décurrence, jaune pâle vers la marge et jaune-orangé dans le fond; arête un peu irrégulière.

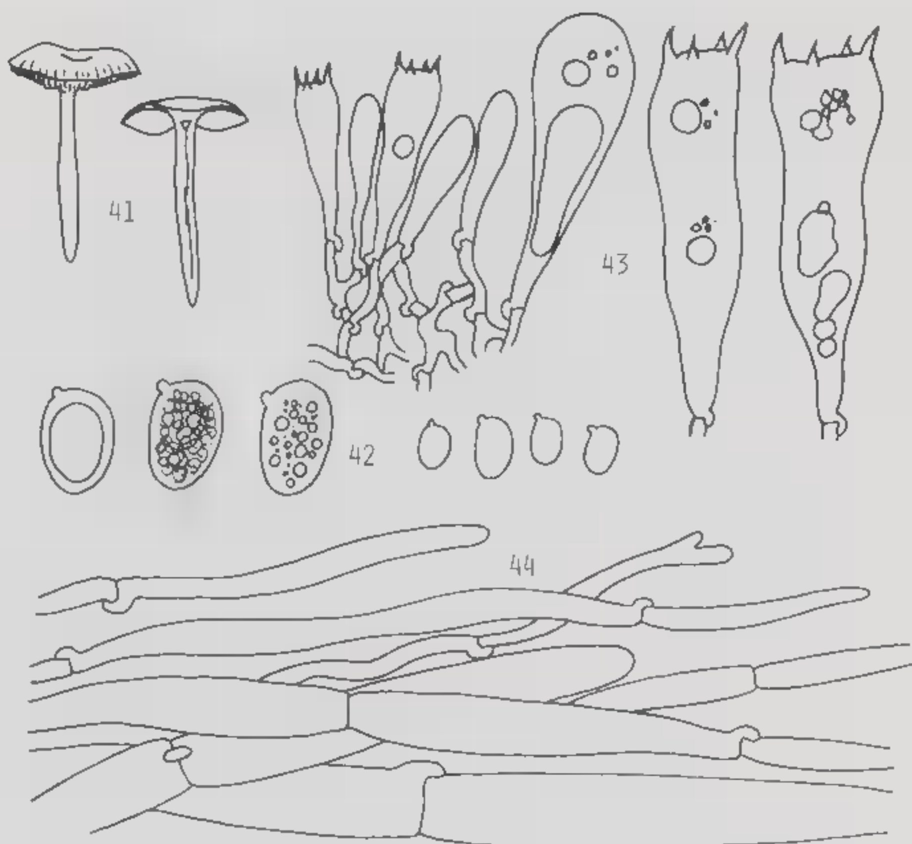


Fig. 41-44: *Hygrocybe* taxon 3. 41: basidiocarpe et coupe; 42: macro- et microspores; 43: hyménium et sous-hyménium avec deux macrobasides isolées; 44: suprapellis.

Stipe 30 x 2-3,5mm, un peu collant, avec une cavité triangulaire au sommet (pointe en bas), cylindracé, atténué à la base, nu.
Chair concolore aux surfaces. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores dimorphes (Fig. 42); macrospores 13-14 x 7-8μm, cylindroelliptiques à contenu vacuolisé ou nuageux; microspores 5-6,5 x 4-4,5μm elliptiques sublarmiformes ou plus ou moins cylindro-elliptiques, optiquement vides.
Basides 4-sporiques dimorphes (Fig. 43); macrobasides 40-55 x 3-15μm, clavées avec parfois une constriction médiane, avec de larges vacuoles ou à contenu marbré nuageux; microbasides 28-35 x 3-8μm, cylindro-clavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles et poils marginaux non observés. Arête homomorphe.

Sous-hyménium (Fig. 43) filamenteux emmêlé. Trame subrégulière à hyphes x 3-20µm, gélifiée en profondeur. Laticifères abondants dans la trame, la cuticule et la chair.
Cuticule (Fig. 44): suprapellis en cutis peu différencié, à hyphes couchées x 3-13µm. Mediopellis à hyphes x 10-25µm. Pigment vacuolaire dominant, peut-être accompagné d'un léger pigment membranaire lisse.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore.

- Récolte: environs du Saut Pararé (Arataye); terre nue dans la forêt dense; le 1.03.88; Leg.: RC, n° RC/GF88.408 (PC).

- Discussion: appartenant toujours au même groupe, cette récolte se distingue de *H. occidentalis* type par sa petite taille, son stipe plein, ses lames assez fines et serrées, et des 2 récoltes précédentes par un ensemble de caractères macro- et microscopiques (revêtement un peu collant, pigment vacuolaire plus abondant, sous-hyménium, etc...). Comme elles, elle ne semble pas suffisamment individualisée pour justifier une création d'espèce et devra être retrouvée pour autoriser une conclusion définitive.

10. *Hygrocybe* taxon 4 (ad *H. occidentalis*)

- Description macroscopique (Fig. 45): Pileus 34mm de diamètre, en soucoupe sans mamelon, troué au centre, jaune-orangé à centre jaune, strié d'orangé rougeâtre; marge dentée fissile; cuticule un peu fibrilleuse radialement.
Lames espacées, épaisses avec lamelles et lamellules irrégulières, ventrues, largement émarginées sublibres mais avec une dent de décurrence contre le stipe, orange saumoné peu foncé (orange vu de face). Arête un peu irrégulière, plus claire, jaunâtre.
Stipe élancé, 70 x 3-4,5mm, creux, cylindracé, atténué à subradicant en bas, jaune pâle uniforme à léger reflet citrin, glabre.
Chair jaune citrin, plus orangée dans le chapeau et un peu grise à l'extrême base (détersion?). Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 46) dimorphes: macrospores 11-15-(16) x 6-8-(9)µm, cylindro-étranglées à subpyriformes, généralement élargies en avant, à vacuoles ou à contenu pailleté nuageux; microspores (5,5)-6-9 x 4-5µm, elliptiques à cylindro-elliptiques sublarmiformes, généralement assez trapues, optiquement vides ou avec 1 ou 2 petites vacuoles. Les microspores sont moins mûres que les macrospores.
Basides (Fig. 47) 4-sporiques dimorphes: macrobasides 40-55 x 4-13µm, largement clavées, vite collapsées; microbasides 30-40 x 3-9µm cylindro-clavées à stérigmates allongés, jusqu'à 10µm, jeunes ou immatures (à la différence des macrobasides, agées).
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles et poils marginaux non observés.
Sous-hyménium (Fig. 47) subcelluleux à éléments en pièces de puzzle, plus emmêlé en profondeur. Trame subrégulière à hyphes x 3-18µm. Laticifères présents mais rares dans la trame, et peu courants dans la cuticule.
Cuticule (Fig. 48): suprapellis en cutis peu différencié, à hyphes x 3-15µm. Mediopellis à hyphes jusque x 25µm. Pigment faible, intracellulaire dominant.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore, sans tendance à être ansiformes.

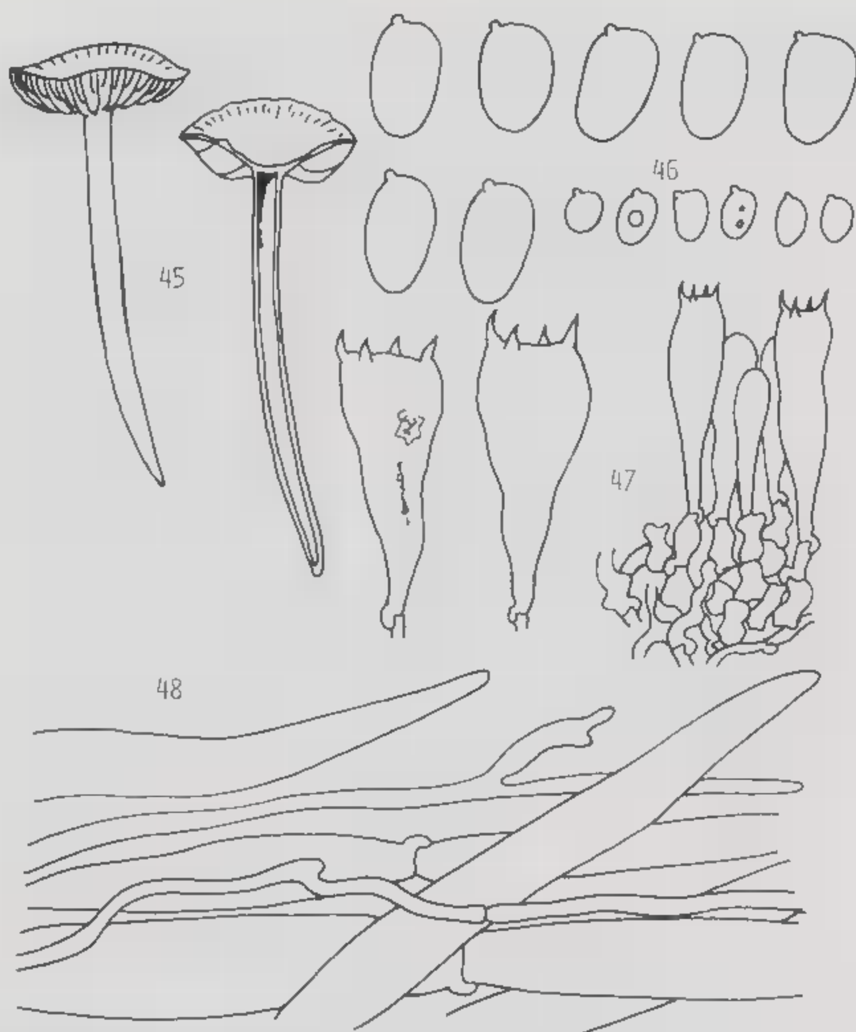


Fig. 45-48: *Hygrocybe* taxon 4. 45: basidiocarpe et coupe; 46: macro- et microspores; 47: 2 macrobasides et microbasides avec sous-hyménium; 48: suprapellis.

- Récolte: environs du Saut Pararé (Arataye); sur terre nue en forêt dense; le 8.03.88; Leg.: RC, n° RC/GF88.438 (PC).

- Discussion: si cette récolte se rapproche de *H. occidentalis* par son stipe creux subperforé, ses lames colorées, son stipe fragile à chair aqueuse, il s'en éloigne, de même que des autres récoltes décrites précédemment, par la couleur jaune pâle, presque citrine de son stipe qui a tendance à grisonner vers la base,

la morphologie de ses spores, principalement les macrospores, très grandes et de silhouette "spéciale", et par son sous-hyménium subcelluleux. Comme pour les précédentes, une seule récolte ne suffit pas à isoler ce champignon dans un taxon nouveau.

Remarquons, à nouveau, l'évidence de la maturation diachronique des macro- et des microspores. Ici, les macrobasides sont déjà collapsées ou âgées, alors que les microbasides sont encore jeunes et partiellement immatures.

11. ***Hygrocybe nouraguensis*** **Courtec.** ***nov. sp.***

Species sectionis Firmae, *inter* H. trinitensem *(Dennis) Pegler et* H. sipariam *(Berk.) Singer media.*

Pileus 8mm latus, convexus, apice applanato, vivide ruber, hygrophanus, in disco ad aurantio-luteum decolorans. Margo pilei minute denticulatus, striolatus. Cuticula sicca, subtiliter et conferte squamulosa. Lamellae spissae, distantes, arquatae, valde decurrentes, albae cum in sinu pallide aurantiaco repercussu. Stipes 27 x 1,5-2mm, cylindraceus, paulum flexuosum, tumulosus, vivide ruber, deorsum subaurantiacus, sursum brevissime villosus, siccus. Caro in pileo vivide rubra, hygrophana, siccitate pallide rubra, in stipite aurantiaca, ad basim albida.

Sporae dimorphae: macrosporae 12-13-(14) x 7-9-(10)µm, breviter ellipticae, raro substrangulatae; microsporae 6-7,5 x 4-5µm, minus compactae, apiculo prominenti. Basidia 4-sporica, dimorpha: macrobasidia 55-75 x 4-15µm, late clavata; microbasidia 30-45-(55) x 2-8µm, cylindro-clavata. Cystidia nulla. Subhymenium intricatum ex hyphis tortuosis. Trama subregularis. Suprapellis subtrichodermica hyphis articulatis x 7-18µm. Pigmentum probabiliter parietale, laeve. Fibulae praesentes.

Typus: circa Nouragues montes (in Guyana Gallica) lectus, in fruticibus Clusiae cum numerosis Bromeliaceis, in humo et fortasse ligneis frustulis insititius. 15.02.1988. Leg.: RC, n° RC/GF88.048 (PC).

- Description macroscopique (Fig. 49): Pileus 8mm de diamètre, convexe à sommet aplati et marge un peu contractée, rouge vif, mais décolorant en jaune orangé par le sec (hygrophanéité) au disque; marge finement et obtusément denticulée, striolée; cuticule finement et densément squamuleuse, sèche.
Lames épaisses et espacées avec quelques lamelles très courtes, arquées fortement décurrentes, blanches avec un très léger reflet orangé pâle dans le fond; arête entière.
Stipe 27 x 1,5-2mm, cylindracé, plus ou moins flexueux et assez irrégulier (comprimé cabossé), rouge vif à faible nuance orangée au sommet, orangé en bas, très courtement villeux au sommet, mat, sec, un peu chagriné ailleurs.
Chair rouge vif dans le chapeau mais hygrophane, devenant rouge pâle par le sec, plus ou moins orangée dans le stipe, blanchâtre en bas. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 50) dimorphes: macrospores 12-13-(14) x 7-9-(10)µm courtement elliptiques, rarement subétranglées; microspores 6-7,5 x 4-5µm, moins trapues en moyenne, elliptiques, à apicule saillant.

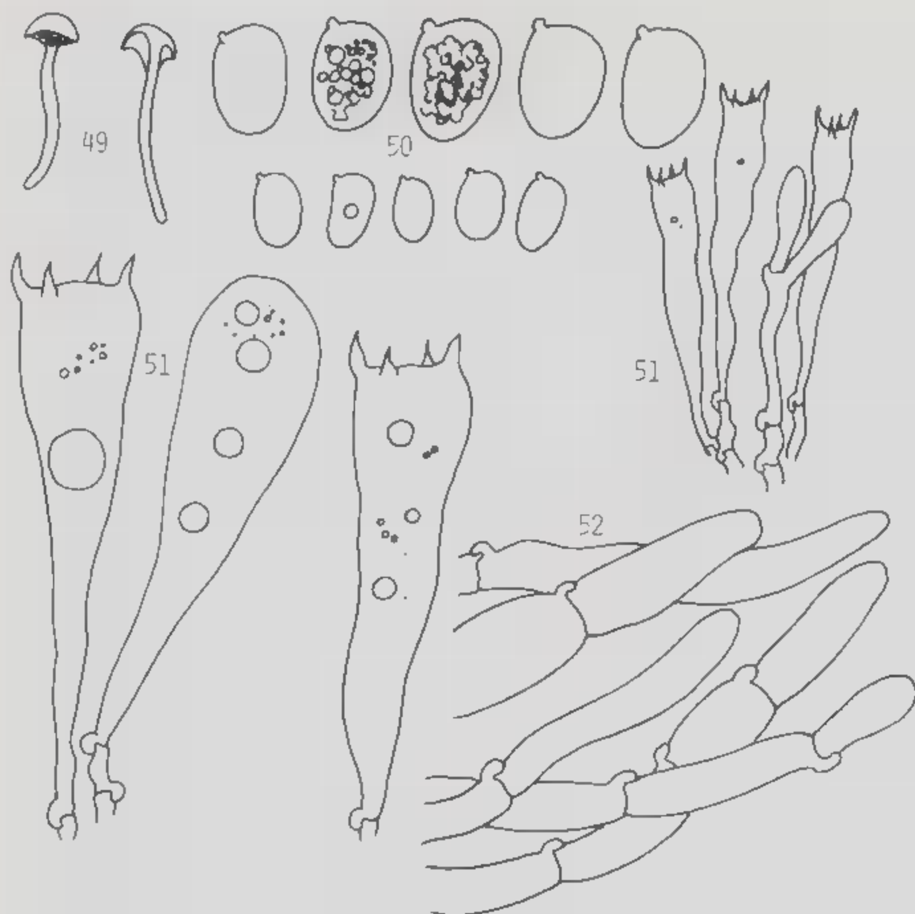


Fig. 49-52: *Hygrocybe nouraguensis* Courtec. 49: basidiocarpe et coupe; 50: macro et microspores; 51: macro et microbasides avec un fragment de sous-hyménium; 52: suprapellis.

Basides (Fig. 51) 4-sporiques, dimorphes: macrobasides 55-75 x 4-15μm, largement clavées, avec de grandes vacuoles; microbasides 30-45-(55) x 2-8μm, cylindroclavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles et poils marginaux absents.
Sous-hyménium (Fig. 51) à éléments courts, tortueux, bouclés. Trame régulière à subrégulière. Laticifères non observés.
Cuticule (Fig. 52): suprapellis subtrichodermique à hyphes articulées en boudins x 7-18μm. Pigment vraisemblablement membranaire lisse.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore, amples, mais non ansiformes.

- Récolte: environs de l'inselberg des Nouragues; savane-roche avec de nombreuses *Bromeliaceae* dans un fourré de *Clusia*, dans l'humus et très proche, sinon greffé sur des débris ligneux; le 15.02.88; Leg.: RC, n° RC/GF88.048 (PC).

- Discussion: cette espèce est très intéressante car elle semble intermédiaire entre *H. trinitensis* (Dennis) Pegler et *H. siparia* (Berk.) Singer. Elle se rapproche de la première par sa petite taille, sa teinte piléique rouge vermillon vif, ses lames décurrentes. Par ces caractères, elle évoque fortement la planche I, 11 de Dennis (1970). Elle s'éloigne pourtant de cette espèce par ses lames très blanches, contrastant avec la couleur générale du basidiocarpe, mais aussi par ses macrospores beaucoup plus trapues (Q vers 1,5 au lieu de 1,74 selon Pegler, 1983: 73), ses basides plus grandes, et surtout sa cuticule subtrichodermique à éléments épais, un peu couchés (*H. trinitensis* possède un cutis indifférencié). D'après Pegler (1983: 75), *H. batistae* Singer est également proche de *H. trinitensis* et possède des basidiocarpes un peu plus grands (jusqu'à 20mm) et des lames blanches. Les différences sporales et cuticulaires n'étant pas soulignées, nous en déduisons que l'espèce de Singer ne se distingue pas de celle de Dennis de ces points de vue et que notre taxon ne peut donc pas lui être attribué. Quant à *H. siparia*, s'il possède bien un trichoderme très évident, ses spores ne sont pas tout à fait aussi trapues, ses lames, en principe colorées, pas aussi décurrentes et sa couleur est plus "spéciale", cramoisie ou framboise, non vermillon. Les exemplaires typiques de *H. siparia* que nous décrivons plus loin ne pouvaient pas être confondus, sur le terrain, avec la présente récolte que nous proposons donc comme nouvelle.

12. *Hygrocybe cheilocystidiata* Courtec. *nov. sp.*

Species sectionis Firmae, *coloribus persaturatis, lamellarum acie crassissima, numerosis marginalibus pili atque tramae cuticulaque hypharum crassitudine facile distincta.*

Pileus 14mm latus, convexus, scarletino-ruber, siccitate vivide aurantiaco-roseus, radialiter fibrillosus. Margine paulum denticulato, haud striato. Cuticula sicca, aliquantum fibrillosa. Lamellae spissae, distantes, horizontales vel sinuatae, valde emarginatae, vivide aurantiaco-rubrae. Acies percrassa, erosa. Stipes 31 x 1-5mm, fistulosus, cylindraceus, supra vivide ruber, infra aurantiacus, ad basim luteolus, glaber vel paulum fibro-caperatus. Caro tenuis, concolor.

Sporae dimorphae: macrosporae 12-15 x 6,5-8,5µm, cylindro-ellipticae; microsporae 6,5-8,5 x 4-5,5µm, breviter ellipticae. Basidia 4-sporica, dimorpha: macrobasidia 40-60 x 5-15µm, late clavata; microbasidia (interdum 2-sporica) 25-32 x 4-8(9)µm cylindro-clavata. Pleurocystidia nulla. Marginis pili copiosissimi, 30-70 x 5-15µm, clavata, interdum ramosa-articulata, complexa. Subhymenium ± subcellulare. Trama subregularis, in mediostrato cum hyphis admodum inflatis, usque ad 45-(60)µm. Suprapellis hyphae valde inflatae 60-200 x 30-60-(70)µm. Mediopellis hyphae giganteae. Caulicutis cum nonnullis pilis, marginales pilo revocantibus. Fibulae numerosae.

Typus: circa "Saut Pararé" (Arataye, in Guyana Gallica) lectus, in terra nuda silvae densae. 9.03.1988. Leg.: RC, n° RC GF88.593 (PC).

- Description macroscopique (Fig. 53): Pileus de 14mm de diamètre, convexe, assez plat au sommet, rouge écarlate à fibrilles radiales rose-orangé vif par la

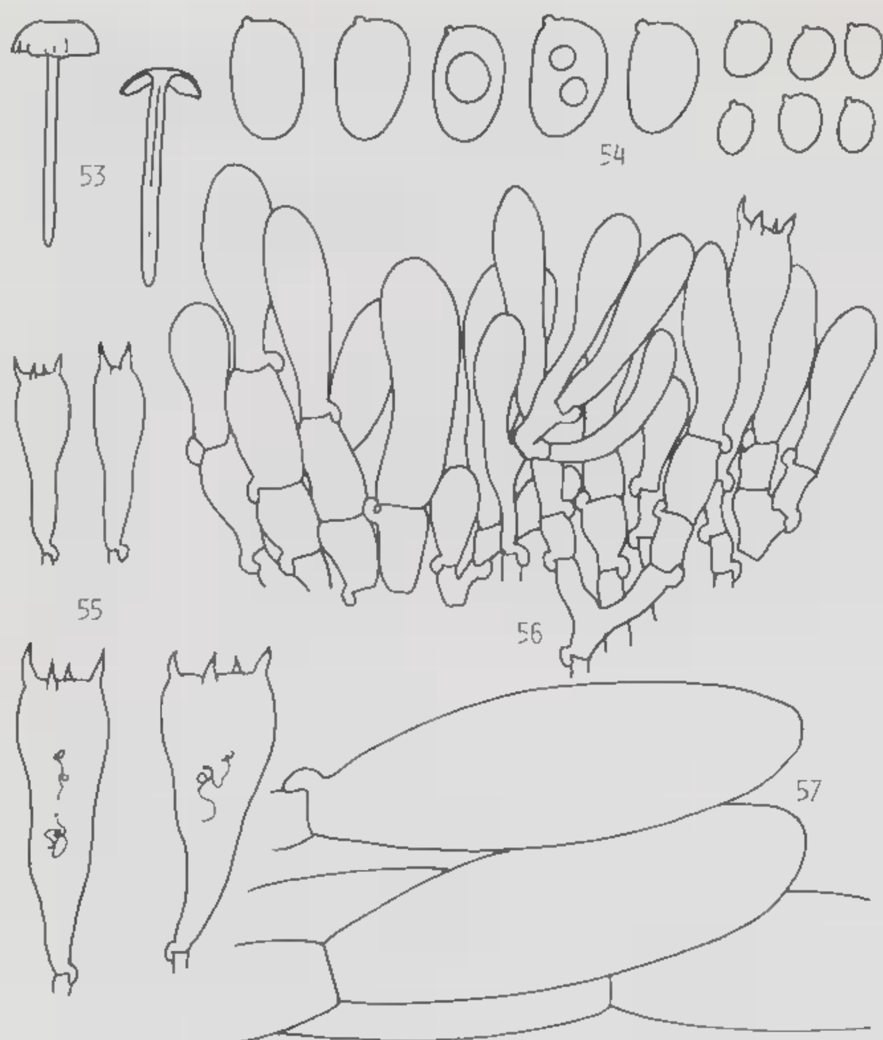


Fig. 53-57: *Hygrocybe cheilocystidiata* Courtec. 53: basidiocarpe et coupe; 54: macro- et microspores; 55: macro-et microbasides; 56: poils marginaux; 57: éléments du suprapellis.

dessiccation; marge un peu dentée, peu striée, à peine plus orangée; cuticule sèche, un peu fibrilleuse.
Lames épaisses, espacées avec lamelles irrégulières, horizontales à sinuées, profondément échancrées, rouge-orangé vif saturé, presque concolores au chapeau vers la marge; arête remarquablement épaisse et un peu érodée.

Stipe 31 x 1,5mm, fistuleux, cylindracé, rouge vif en haut, plus orangé vers le bas, jaunâtre à la base, glabre ou un peu fibro-ridé.
Chair mince dans le chapeau, concolore aux surfaces. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 54) dimorphes: macrospores 12-15 x 6,5-8,5μm cylindro-elliptiques avec des vacuoles souvent grandes; microspores 6,5-8,5 x 4-5,5μm, courtement elliptiques, optiquement vides.
Basides (Fig. 55) 4-sporiques dimorphes: macrobasides 40-60 x 5-15μm, largement clavées parfois avec une constriction médiane, à contenu souvent précipité marbré pailleté; microbasides (parfois bisporiques) 25-32 x 4-8-(9)μm, cylindro-clavées, optiquement vides.
Pleurocystides nulles. Arête couverte de poils marginaux remarquablement abondants (Fig. 56), la rendant stérile ou presque, 30-70 x 5-15μm, clavés, parfois articulés, souvent en bouquets complexes, ramifiés.
Sous-hyménium subcelluleux à éléments en pièces de puzzle et filamenteux emmêlé. Trame subparallèle à hyphes remarquablement renflées dans la médiostrate, jusque x 45-(60)μm. Laticifères non observés.
Cuticule (Fig. 57): suprapellis remarquable: formé d'hyphes fortement enflées, 60-200 x 30-60-(70)μm; médiopellis à hyphes énormes.
Caulocutis garni de quelques gros poils évoquant les poils marginaux. Trame parallèle.
Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore.

- Récolte: environs du Saut Pararé (Arataye); sur terre nue dans la forêt dense; le 9.03.88; Leg.: RC, n° RC GF88.593 (PC).

- Discussion: cette récolte possède plusieurs caractères remarquables qui l'individualisent incontestablement au sein de la section *Firmae*: sur le plan macroscopique, les couleurs très saturées, particulièrement pour l'hyménophore, attirent déjà l'attention, de même que l'arête des lames, très épaisse. Au plan microscopique, ce sont les innombrables poils marginaux (exprimés macroscopiquement par l'épaisseur de l'arête) qui frappent l'observateur; ce caractère, faiblement développé chez *H. occidentalis*, est ici exacerbé à l'extrême et domine les particularités de ce champignon. Les structures de la trame et de la cuticule sont également très originales par la dimension des hyphes constitutives, très largement enflées. Cet ensemble de caractères nous autorise à présenter cette récolte comme espèce nouvelle.

13. ***Hygrocybe siparia*** **(Berk.) Singer**, *Atas Inst. Micol.* 2: 17, 1965.

= *Hygrophorus siparius* Berkeley ap. Hooker, *Hookers J. Bot. Kew Gard. Misc.* 8: 134, 1856.

- Description macroscopique (Fig. 58): Pileus 4-12mm de diamètre, régulièrement bombé convexe, d'un splendide rouge-framboise cramoisi à rose-carminé vif, pâlissant à rose-abricot avec l'âge et la sécheresse, à marginelle parfois plus orangée; marge à peine denticulée presque entière, obscurément et courtement striée, un peu fissile avec l'âge; cuticule très mate, veloutée, tomenteuse sous la loupe (tapis brosse ras).

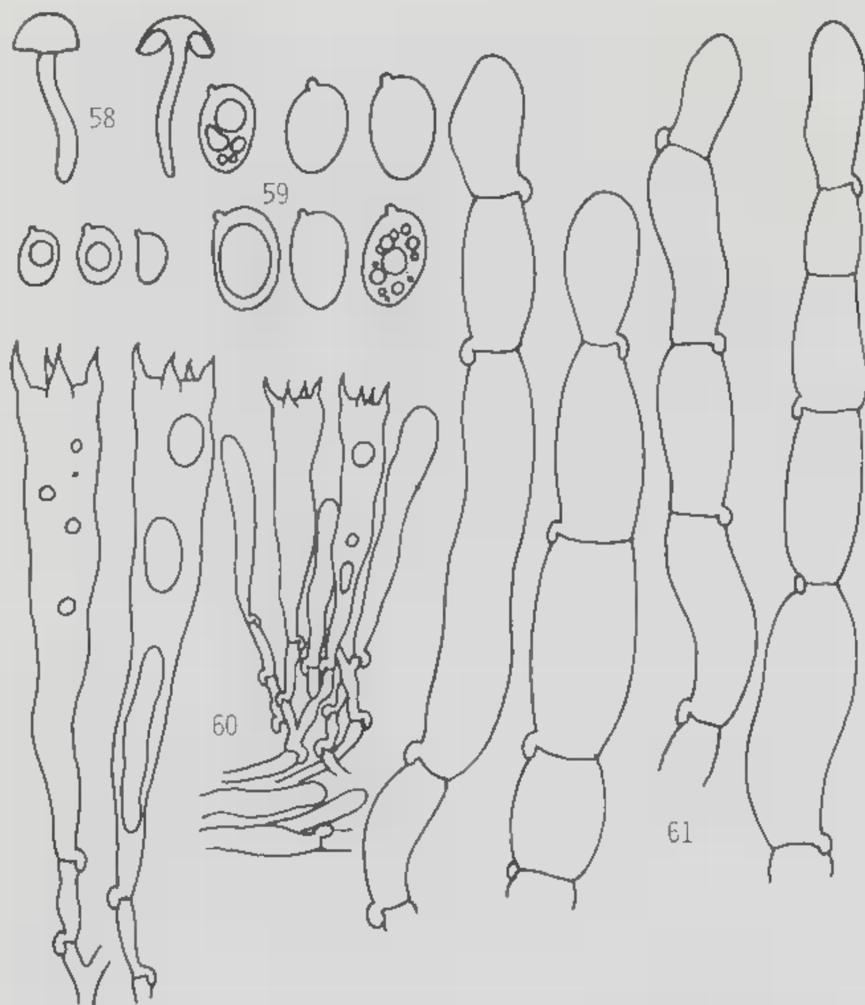


Fig. 58-61: *Hygrocybe siparia* (Berk.) Singer. 58: basidiocarpe et section; 59: macro- et microspores; 60: macro- et microbasides avec le sous-hyménium; 61: suprapellis.

Lames assez peu épaisses, peu serrées avec lamelles irrégulières, très hautes, sinuées, profondément émarginées avec une dent de décurrence, blanches, parfois à reflet carminé pâle ou jaunâtre; arête irrégulière vaguement érodée.
Stipe 25 x 2mm, un peu fistuleux ou aérifère au centre, cylindracé flexueux, jaune pâle à reflet carné ou vaguement orangé en haut, parfois entièrement rougeâtre, glabre.

Chair jaune rosâtre très pâle dans le chapeau, jaune pâle dans le stipe. Odeur nulle ou légèrement désagréable (eau croupie?) faible, et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 59) dimorphes: macrospores 10,5-13,3 x 6-7,8μm cylindro-elliptiques à elliptiques, parfois subamygdaliformes à apicule volumineux, à contenu vacuolisé ou guttulé; microspores 5,5-7,5 x 3,5-5μm, elliptiques à elliptico-larmiformes avec parfois quelques vacuoles.
Basides (Fig. 60) 4-sporiques dimorphes: macrobasides 45-70 x 5-12μm, longuement clavées, avec de grandes vacuoles ou à contenu pailleté marbré; microbasides 33-45 x 2-7μm, cylindro-clavées.
Pleurocystides nulles. Cheilocystides nulles. Arête fertile homomorphe.
Sous-hyménium (Fig. 60) emmêlé à cellules allongées. Trame subrégulière à hyphes x 3-8μm. Laticifères non observés.
Cuticule (Fig. 61): trichoderme sec très bien développé, à éléments 20-75-(90) x 6,5-20μm, bouclés. Pigment intracellulaire diffus, peut-être accompagné d'un pigment membranaire lisse discret.

- Récoltes: environs du Saut Pararé (Arataye); sur terre nue dans la forêt dense; le 1.03.88; Leg. et Det.: RC, n° RC GF88.398 (PC); environs du Saut Pararé (Arataye); sur terre nue dans la forêt dense; le 8.03.88; Leg. et Det.: RC, n° RC/GF88.545 (PC); id. n°RC GF88.545bis (PC).

- Discussion: ces échantillons sont conformes au concept de *H. siparia* développé par Pegler & Fiard (1978: 307). Les quelques différences notées entre nos 3 récoltes ne nous semblent guère importantes, et ne justifient pas de distinctions spécifiques ou infra-spécifiques. Les lames de nos spécimens sont en général plus pâles que ce qui est signalé dans la littérature, les microspores sont parfois plus petites (5,5-6,5 x 3,4-4μm sur le n° 398), les macrobasides plus grandes et le diamètre des éléments cuticulaires supérieur. Signalons encore que notre n° 545 avait le stipe plus rouge et le chapeau plus rose que le n° 398 (le plus proche des descriptions de la littérature) et que le n° 545bis avait la marginelle plus orangée.

On peut se demander si notre *H. nouraguensis* ne correspondrait pas également à cette variation intraspécifique. Nous ne le pensons pas en raison de son aspect macroscopique très particulier (couleur, insertion des lames, aspect de la cuticule sous la loupe, simplement irrégulièrement subsquamuleuse chez *nouraguensis* alors qu'elle est très fortement veloutée hérissée chez *siparia*) et des différences microscopiques détaillées plus haut.

Connu seulement du Brésil, *H. siparia* est nouveau pour la Guyane Française.

14. *Hygrocybe* taxon 5.

Nous terminons cette note consacrée aux *Hygrophoraceae* recueillies en Guyane française, par la description d'une récolte indéterminée et problématique.

- Description macroscopique (Fig. 62): Pileus 8mm de diamètre, légèrement déprimé au centre et à marge bossue, vermillon; marge presque entière, légèrement excédente; cuticule sèche fibrilleuse sur 1/2 rayon et finement squamuleuse au disque.

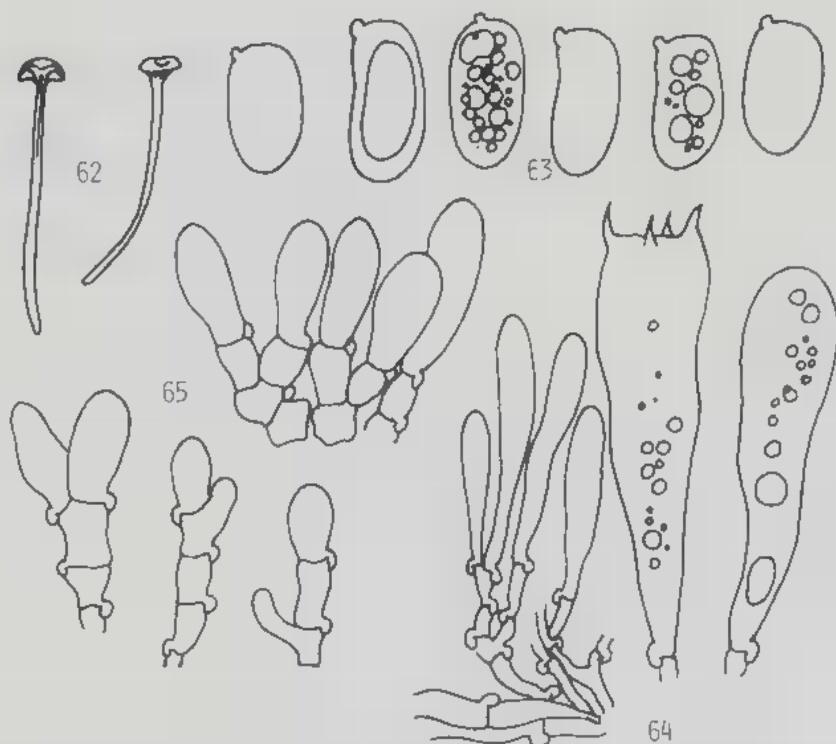


Fig. 62-65: *Hygrocybe* taxon 5. 62: basidiocarpe et coupe; 63: spores; 64: baside mûre avec quelques basidioles et sous-hyménium; 65: poils marginaux.

Lames espacées, épaisses, avec quelques courtes lamellules, ventrues en avant puis sinuées vers le stipe, nettement décurrentes, rouge minium orangé, avec l'arête jaune et légèrement ondulée.
Stipe 42 x 2mm, vaguement fistuleux (moëlle fibreuse), cylindracé arqué, rouge vif au sommet et progressivement éclairci vers le bas en orange, jaune puis blanc à l'extrême base, nu.
Chair mince, concolore aux surfaces mais plus pâle dans la moëlle caulinaire. Odeur nulle et saveur non testée.

- Description microscopique: Spores (Fig. 63) 14-17 x 7-8μm, cylindracées à subphaséolées ou subétranglées, à contenu guttulé à nuageux.
Basides (Fig. 64) 4-sporiques, 45-55 x 5-15μm, largement clavées avec de nombreuses vacuoles. Présence évidente de nombreuses microbasides immatures, cylindro-clavées jusqu'à 35 x 7μm.
Pleurocystides nulles. Arête stérile, couverte de poils marginaux cylindro-clavés articulés à éléments courts et bouclés, 20-25 x 4-8μm (Fig. 65). Sous-hyménium

emmêlé, bouclé, confus. Trame gélifiée subrégulière, à éléments larges, jusqu'à x 20-(30)µm. Laticifères non observés.
Cuticule: suprapellis à éléments en boudins articulés, jusqu'à x 30µm (subtrichodermique).
Boucles abondantes dans toutes les parties.

- Récolte: environs de l'inselberg des Nouragues; sur humus dans la forêt dense; le 15.02.88; Leg.: RC, n° RC/GF88.054 (PC).

- Discussion: cette récolte énigmatique nous semble appartenir à la section *Firmae*, bien que nous n'ayons pas pu trouver de microspores. Elle apporterait une nouvelle preuve de la maturation diachronique des macro- et des microspores dans cette section. Du fait de cette maturité partielle, il n'est pas possible de décrire complètement ce taxon, donc de le présenter comme nouveau.

Pourtant, si l'on admet cette appartenance aux *Firmae*, on ne peut trouver aucun binôme convenable pour cette récolte. Ses grandes macrospores la placent dans le groupe de *H. firma* où sa petite taille, son stipe à peine fistuleux, ses lames minium, décurrentes, et ses arêtes stériles garnies de nombreux poils marginaux lui confèrent, entre autres, une place très originale. Si l'on cherche, malgré cela, dans les espèces à macrospores inférieures à 15µm, on est conduit au groupe de *H. trinitensis* et *H. siparia*. Le premier est exclu par sa cuticule indifférenciée, lisse sous la loupe, et le second, que nous venons de décrire en détail, n'a rien à voir avec cette récolte. La présence de poils marginaux abondants pourrait également faire chercher une parenté du côté de *H. cheilocystidiata* Courtec., mais cette espèce n'a pas les lames décurrentes et possède une cuticule et une trame à éléments fortement renflés, caractère non retrouvé ici. Aucune des espèces décrites par Heinemann (1963) d'Afrique, ni par Pegler (1986) de Sri Lanka n'offre une meilleure correspondance de caractères.

Il faut malheureusement laisser cette intéressante récolte sans nom, en espérant qu'elle sera retrouvée dans un état de maturité complète, afin de préciser son statut.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très vivement les personnes qui nous ont aidé, d'une manière ou d'une autre dans la préparation de cette note: D.N. Pegler (Kew) a bien voulu en approuver les grandes lignes et proposer quelques modifications. D.J. Lodge (Puerto Rico) nous a fourni d'intéressantes informations sur les espèces récoltées par elle à Puerto Rico. P. Escallon (Thonon-les-Bains) s'est chargé de la correction de nos diagnoses latines, M. Bon (St. Valery-sur-Somme) et A.W. Brand (Stratford-upon-Avon) nous ont procuré quelques travaux qui nous manquaient pour mener à bien ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

DENNIS R.W.G., 1953 - Some west-indian collections referred to *Hygrophorus* Fr. *Kew Bull.* 8: 253-268.

DENNIS R.W.G., 1961 - Fungi Venezuelani IV. Agaricales. *Kew Bull.* 15: 67-156.

DENNIS R.W.G., 1970 - Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. *Kew Bull. Add. Ser.* 3: 531p + pl.

GRANVILLE De J.J., 1986 - *Flore et végétation.* Cayenne, 32 p.

HEIM R., 1967 - Hygrophores tropicaux recueillis par Roger Heim 1. *Rev. Mycol. (Paris)* 32: 16-27.

HEINEMANN P., 1963 - Champignons récoltés au Congo par Madame M. Goossens-Fontana V. *Hygrophoraceae. Bull. Jard. Bot. Etat* 33: 421-458.

HESLER L.R. and SMITH A.H., 1963 - *North American species of Hygrophorus.* Knoxville, Univ. Tenn. Press, 416p.

HONGO T., 1980 - Higher fungi of the Bonin Islands III. *Report Tottori Mycol Inst.* 18: 149-155.

HONGO T., 1982 - *Hygrophoraceae* of Japan. *Mem. Fac. Educ. Shiga Univ.* 32: 85-92.

HORAK E., 1968 - Synopsis Generum Agaricalium (Die Gattungstypen der Agaricales). *Beitr. Kryptogamenfl. Schweiz* 13: 1-741.

MONTAGNE C.D.M., 1854 - Cryptogamia Guyanensis seu plantarum cellularum in Guyana gallica annis 1835-1849 a cl Leprieur collectarum enumeratio universalis. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, sér. 4, 1: 91-144.

OLDEMANN R.A.A., 1974 - L'architecture de la forêt guyanaise. *Mém. Orstom* 73: 204p.

PEGLER D.N. & FIARD J.P., 1978 - *Hygrocybe* sect. *Firmae* (Agaricales) in tropical America. *Kew Bull.* 32: 297-312.

PEGLER D.N., 1983 - Agaric flora of the Lesser Antilles. *Kew Bull. Add. Ser.* 9: 668p + pl.

PEGLER D.N., 1986 - Agaric flora of Sri Lanka. *Kew Bull. Add. Ser.* 12: 519p.

SCHNELL R., 1987 - *La flore et la végétation de l'Amérique tropicale.* Tome 1. Généralités. Les flores. Les formations denses et les formations mésophiles. Paris, Masson, 480p.

STEVENSON G., 1962 - The Agaricales of New Zealand IV. *Kew Bull.* 16: 376-384.

Cryptogamie, Mycol., 1989, 10 (3): 217-225

ESTUDIOS MICOLÓGICOS EN EL PARQUE NATURAL DE MONFRAGUE (EXTREMADURA, ESPAÑA) III. APHYLLOPHORALES[1]

M.N. BLANCO*, K. HJORTSTAM**, J.L. MANJÓN* y G. MORENO*

* Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

** Department of Systematic Botany. University of Göteborg. Carl Skottsbergs Gata 22. S-413 19 Göteborg. Sweden.

RESUMEN - Se aportan los primeros resultados en el estudio de los hongos *Aphyllophorales* del Parque Natural de Monfragüe, importante enclave de vegetación mediterránea muy bien conservada. Resaltamos las siguientes cinco especies que, de acuerdo con la bibliografía consultada, son nuevas citas para el catálogo micológico español: *Antrodia malicola* (Berk. & Curt.) Donk, *Phanerochaete avellanea* (Bres.) J. Eriksson & Hjortstam, *Ph. jose-ferreirae* (Reid) Reid, *Tomentella punicea* (Alb. & Schw.: Fr.) Schröter in Cohn y *Vuilleminia cystidiata* Parm.

RÉSUMÉ - On donne ici les premiers résultats de l'étude des champignons du Parc Naturel de Monfragüe, une importante enclave de végétation méditerranéenne très bien conservée. Cinq espèces sont nouvelles pour l'Espagne: *Antrodia malicola* (Berk. & Curt.) Donk, *Phanerochaete avellanea* (Bres.) J. Eriksson & Hjortstam, *Ph. jose-ferreirae* (Reid) Reid, *Tomentella punicea* (Alb. & Schw.: Fr.) Schröter in Cohn et *Vuilleminia cystidiata* Parm.

ABSTRACT - A preliminary mycological study on the *Aphyllophorales* from Monfragüe, a very important Natural Park for its Mediterranean vegetation, is given. We emphasize the following species: *Antrodia malicola* (Berk. & Curt.) Donk, *Phanerochaete avellanea* (Bres.) J. Eriksson & Hjortstam, *Ph. jose-ferreirae* (Reid) Reid, *Tomentella punicea* (Alb. & Schw.: Fr.) Schröcter in Cohn and *Vuilleminia cystidiata* Parm., which, according to the bibliography available are new records for Spain.

MOTS CLÉS : *Aphyllophorales*, Parc Naturel de Monfragüe, Espagne, taxonomie, chorologie.

---

1. Trabajo presentado en el VII Simposio Nacional de Botánica Criptogámica. Madrid. (23-26.9. 1987).

La zona de estudio se localiza en la provincia de Cáceres, consta de una superficie de 17.852 hectáreas y destaca por su interés zoológico-botánico como así fue puesto de manifiesto por Moreno & Esteves-Raventós (1988).

MATERIAL Y MÉTODOS

El material objecto de estudio se recogió principalmente entre 1985 y 1986, y se encuentra depositado en el Departamento de Biología Vegetal (Botánica) de la Universidad de Alcalá de Henares. Se indica protólogo completo de las nuevas especies para España. Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon, Optiphot con sistema automático de fotografía y contraste diferencial "Nomarski".

LOCALIDADES ESTUDIADAS

Las localidades visitadas se enumeran para facilitar su localización, asimismo se consignan las coordenadas U.T.M., la vegetación arbórea dominante y su asociación fitosociológica, de acuerdo con Belmonte (1986), para establecer futuros estudios micológicos comparativos.

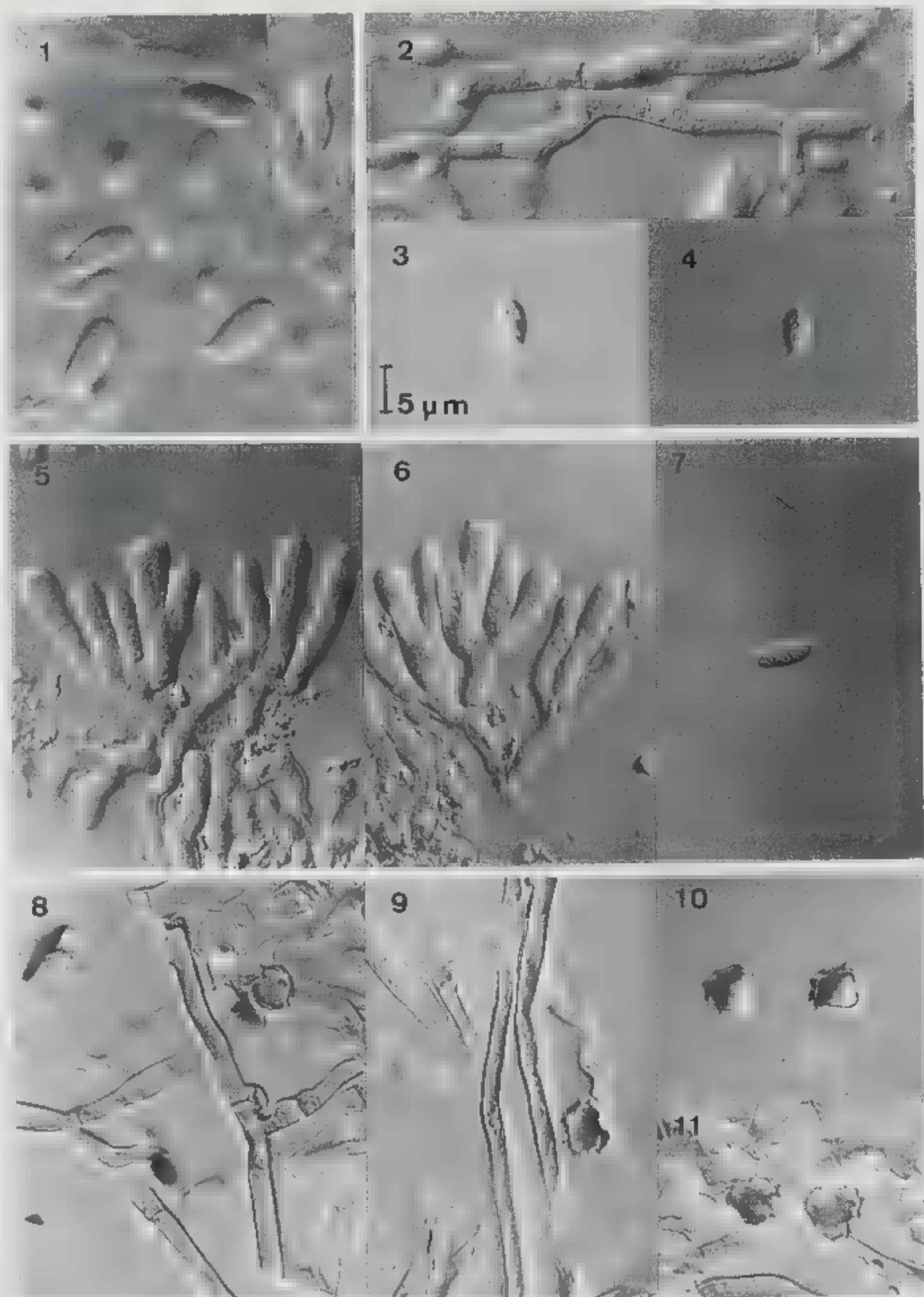
loc. 1 : Cortijo de las Corchuelas del Notario, 29 SQE 5312
Encinar: *Pyro bourgaeanae-Quercetum rotundifoliae*
loc. 2 : Finca las Cansinas, 30 TSK 4814
Alcornocal: *Sanguisorbo agrimonioidis-Quercetum suberis*
Aliseda: *Scrophulario scorodoniae-Alnetum glutinosae*
loc. 3 : La Fresnera, 30 STK 4716
Alcornocal: *Sanguisorbo agrimonioidis-Quercetum suberis*
loc. 4 : Majada del Serrano, 29 SQE 5515
Eucaliptal de repoblación
loc. 5 : Proximidades a la Ermita Virgen de las Mercedes, 29 SQE 4716
Jaral: *Genisto hirsutae-Cistetum ladaniferi*
loc. 6 : Puente arroyo del Barbaon, 29 SQE 4818
Aliseda: *Scrophulario scorodoniae-Alnetum glutinosae*
loc. 7 : Puerto de la Casareja, 29 SQE 5216
Eucaliptal de repoblación
loc. 8 : Umbría Castillo de Monfragüe, 29 SQE 5313
Madroñal: *Phyllyreo angustifoliae-Arbutetum unedi*
loc. 9 : Villareal de San Carlos (Arroyo de Malvecino), 29 SQE 5315
Eucaliptal de repoblación.

CATÁLOGO DE ESPECIES

Antrodia malicola (Berk. & M.A. Curt.) Donk, *Persoonia* 4: 340 (1966)

En leño de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, de un eucaliptal, loc. 7, 23.II.86, n° 9532.

Cuerpo fructífero resupinado, de color crema a marrón. Himenóforo tubular con poros de 1-3 por mm. Sistema de hifas dimítico. Hifas generativas de 2-4μm de diámetro, hialinas y fibuladas. Hifas esqueléticas de pared gruesa, de 3-5μm



Figs. 1-11 - 1: *Antrodia malicola* (Berk. & Curt.) Donk, esporas (n° 9532). 2-4: *Phanerochaete avellanea* (Bres.) J. Eriksson & Hjörtstam, hifas del subiculo y esporas (n° 9813). 5-7: *Ph. jose-ferreirae* (Reid) Reid, himenio y espora (n° 9810). 8-11: *Tomentella punicea* (Alb. & Schw.: Fr.) Schroet. in Cohn., hifas del subiculo y esporas (n° 9433).

de diámetro. Esporas cilindrico-elipsoidales, de 9-13 x 4-5µm, de pared lisa, hialinas, lisas y no amiloides, (Fig. 1).

Observaciones. Especie microscópicamente próxima a *Antrodia heteromorpha* y *A. albida*, pero estas últimas tienen basidiocarpos con coloraciones más claras. Raro taxon presente en América del norte (Lindsey & Gilbertson, 1978) y recogido en ocasiones del centro y sur de Europa (Ryvarden, com. pers.). Es una nueva cita para España.

Botryohypochnus isabellinus (Fr.) J. Eriksson

En madera de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, loc. 2, 25.X.86, n°9865.

Laeticorticium macrosporum (Bres.) J. Eriksson & Ryv.

En madera de *Eucalyptus camaldulensis*, loc. 9, 15.XI.86, n° 9870.

Observaciones. En España es una especie frecuente y ampliamente citada en la bibliografía. Conocida con anterioridad de la provincia de Cáceres (Tellería, 1980).

Meruliopsis hirtella (Burt) Ginns

En madera de *Eucalyptus camaldulensis*, loc. 4, 25.X.86, n° 9829. En *Cistus ladanifer*, loc. 8, 24.X.86, n° 9830.

Paullicorticium niveo-cremeum (Höhn. & Litsch.) Oberw. ex Jülich

En *Alnus glutinosa*, loc. 2, 22.XI.85, n° 9397. En *Alnus glutinosa*, loc. 6, 15.XI.86, n° 9900.

Perenniporia medulla-pannis (Fr.) Donk

En *Cistus ladanifer*, loc. 2, 21.XI.85, n° 9415.

Phanerochaete avellanea (Bres. *in* H. Bourdot & Galzin) J. Eriksson & Hjortstam *in* J. Eriksson & al., Cortic. N. Europe 6: 1072 (1981)

En restos de *Eucalyptus camaldulensis*, loc. 4, 25.X.86, n° 9813. En corteza y leño de *Quercus suber*, loc. 2, 16.VI.86, n° 9641.

Cuerpo fructífero resupinado, membranoso a crustáceo, muy adherido al sustrato, de color blanquecino-cremoso a marrón claro, liso pero resquebrajándose en grietas transversales con la desecación. Subículo y subhimenio blanquecino a ligeramente pálido.

Sistema de hifas monomítico. Subículo muy estrecho, formado por hifas muy entretejidas, raramente paralelas al sustrato, de hasta 6,5µm de diámetro, sin fíbulas y de paredes finas (Fig. 2). Basidios claviformes, de 30-35 X 5-6µm, tetraspóricos y no fibulados. Esporas elipsoidales, de 5,5-7 x 3-3,5µm, hialinas, lisas y no amiloides (Fig. 3-4).

Observaciones. Especie no citada en España peninsular y quizás confundida con táxones próximos como *Phanerochaete tuberculata* y *Ph. galactites*. Pero la ausencia de rizomorfos en el margen del basidiocarpo, el estrecho subiculo de hifas muy entretejidas totalmente desprovistas de fíbulas y las esporas de menor anchura definen ■ *Ph. avellanea*.

Phanerochaete jose-ferreirae (Reid) Reid, *Acta Bot. Croat.* 34: 135 (1975)

En leño de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, loc. 8, 24.X.1986, nº 9810, 9845. *Ibidem*, 25.X.1986, nº 9844. En tronco de *Arbutus unedo*, loc. 8, 14.XI.1986, nº 9893, 9894 y 9895.

Cuerpo fructífero, orbicular-confluente, membranoso, liso, al secar de color crema a crema-anaranjado. Subículo blanquecino de coloracion más clara que el himenio. Margen poco diferenciado.

Sistema de hifas monomítico. Hifas del subículo de paredes gruesas, entretejidas, de 3-4(5)µm de diámetro, con abundantes ramificaciones y sin fíbulas. Cistidios ausentes. Basidios claviformes de 30-35 x 5-6,5µm (Fig. 5-6). Esporas alantoides, lisas, hialinas y no amiloides, miden de (6)7-9 x 2,5-3µm (Fig. 7).

Observaciones. Esta especie descrita de la Serra da Arrabida (Portugal) por Reid (1965) no aparece citada en España peninsular. Su hallazgo en el Parque Natural de Monfragüe (Cáceres) es lógico por su proximidad a Portugal y quizás se presente como un taxón muy abundante en las biomasas mediterráneas. Coincide a nivel de subículo con las dimensiones señaladas por Eriksson & al. (1981), pero difiere morfológicamente de estos últimos autores asemejandose a la estructura apuntada por Burdsall (1985) como textura "intricata" propuesta por Hawksworth & al. (1983).

Phanerochaete magnoliae (Berk. & M.A. Curt.) Burdsall, *Mycologia Mem.* 10: 95 (1985)
= *Ph. raduloides* J. Eriksson & Ryv.

En restos de *Quercus suber*, loc. 2, 22.XI.1985, 9818, *Ibidem*, 16.V.86, 17.V.1986, 23.X.1986, nº 9832, 9643, 9842, 9843 y 9847. En leño de *Quercus suber*, loc. 3, 18.V.1986, nº 9834.

Observaciones. Citada recientemente para España peninsular de Avila (Pou & Tellería, 1985) y de Vizcaya (Salcedo & Tellería, 1986).

Phanerochaete martelliana (Bres.) J. Eriksson & Ryv.

En restos leñosos de *Quercus suber*, loc. 2, 22.II.1986, nº 9562 y 9821. En rama muerta de *Alnus glutinosa*, loc. 2, 22.XI.1985, nº 9509. Sobre *Funalia extenuata*, loc. 2, 22.II.1986, nº 9530. En restos leñosos de *Quercus suber*, loc. 8, 17.V.1986, nº 9563 y 9595. En ramas muertas de *Quercus suber*, loc. 5, 25.X.1986, nº 9822. Sobre troncos de *Cistus ladanifer*, loc.3, 23.X.1986, nº 9839, 9841 y 9846.

Observaciones. Algunos de nuestras recolecciones difieren de las medidas basidiales que alcanzan hasta 70 x 8µm, en contraste con las indicadas por Burdsall (1985) de 35-45 x 6-7µm.

Es una especie muy frecuente y característica de estas biomasas mediterráneas, citada anteriormente de Guadalajara por Manjón & Moreno (1982), de Avila por Pou & Tellería (1985) y de Asturias, Cantabria y Leon por Dueñas (1986).

Phanerochaete ravenelii (Cooke) Burdsall
= *Metulodontia roumeguerii* (Bres.) Parm.
= *Phlebiopsis roumeguerii* (Bres.) Jülich & Stalpers

En restos leñosos de *Cistus ladanifer*, loc. 8, 17.V.1986, nº 9812. En ramas muertas de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, loc. 8, 24.X.1986, nº 9831.

Phanerochaete sanguinea (Fr.) Pouzar

En restos leñosos de *Quercus suber*, loc. 2, 22.II.1986, n° 9510.

Observaciones. Especie ampliamente repartida por la mitad norte de la peninsula (Dueñas, 1986).

Phanerochaete sordida (Karst.) J. Eriksson & Ryv.

Sobre ramas muertas de *Quercus suber*, loc. 2, 22.II.1986, n° 9819.

Observaciones. Especie de amplia distribución por nuestra geografía.

Phlebiella vaga (Fr.) Karst.

En ramas muertas de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, loc. 8, 17.V.1986, n° 9577. En ramas muertas de *Cistus ladanifer*, loc. 8, 14.XI.1986, n° 9920. En restos leñosos de *Quercus suber*, loc.8, 24.X.1986, n° 9815.

Polyporus meridionalis (David) Jahn

En ramas muertas de *Cistus ladanifer*, loc. 2, 21.XI.1985, n° 9418.

Sistotrema diademiferum (H. Bourdot & Galzin) Donk

En ramas muertas de *Cistus ladanifer*, de un eucaliptal, loc. 4, 25.X.1986, n°9866.

Subulicystidium longisporum (Pat.) Parm.

En restos leñosos de *Quercus suber*, loc. 3, 22.II.1986, n° 9438. En restos leñosos de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, 26.X.86, loc. 1, n° 9826. En ramas muertas de *Cistus ladanifer*, loc. 2, 24.X.86, n° 9879.

Tomentella ferruginea (Pers.: Fr.) Pat.

En restos leñosos de *Quercus faginea*, loc. 8, 24.X.1986, n° 9877.

Las descripciónes macro y microscópica coinciden con Larsen (1974). Sistema de hifas dimitico, con hifas esqueléticas estrechas de 2-2,5μm de diámetro, localizadas en los abundantes cordones miceliales, ausencia de cistidios y esporas esférico-lobuladas de 7-8μm de diámetro, espinosas y de color marrón pálido.

Observaciones. Una especie próxima y también dimitica es *Tomentellina fibrosa* (Berk. & Curt.) Larsen, pero difiere principalmente por presentar ésta cistidios de dobles paredes.

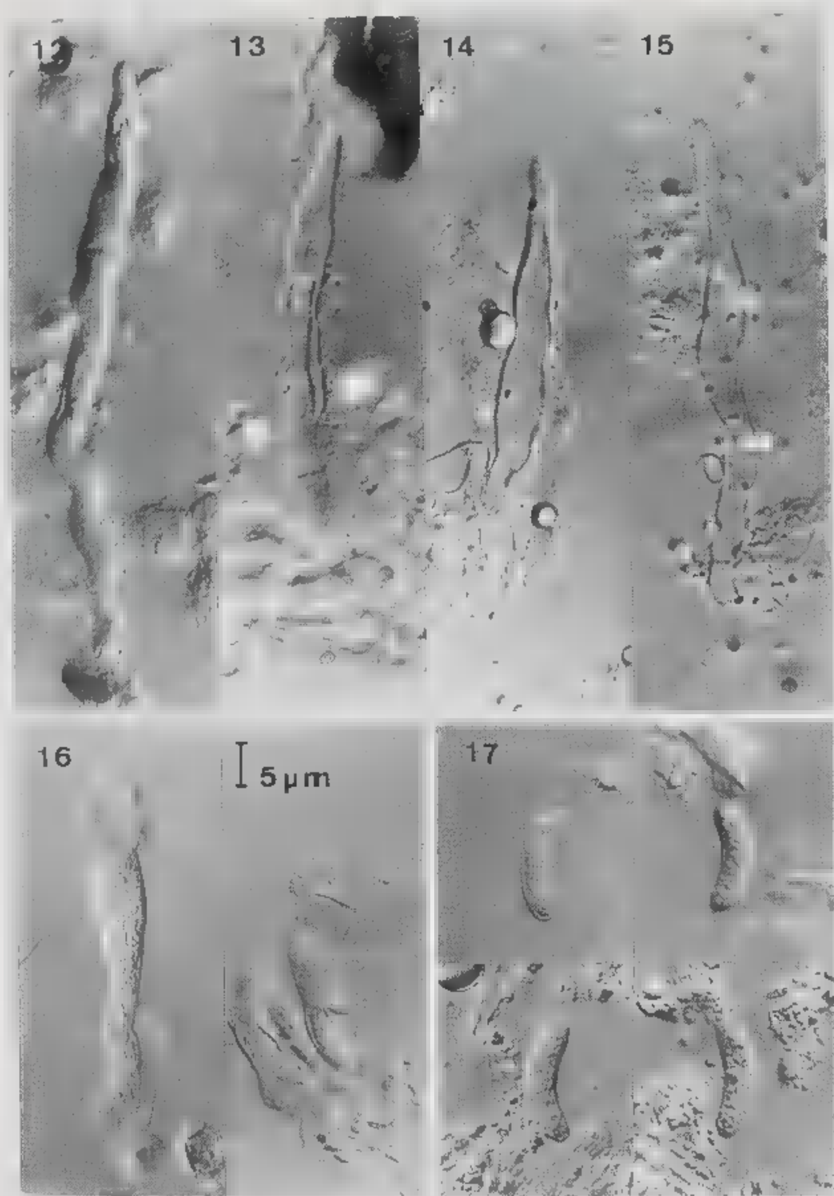
Citada en España principalmente de Cataluña (Maublanc, 1936; Heim & al., 1934; Malençon & Bertault, 1971) y de Vizcaya (Hjortstam & al., 1981).

Tomentella punicea (Alb. & Schw.: Fr.) Schröter *in* Cohn, Krypt.-Fl. Schlesien 3: 420 (1889)

En restos leñosos calcinados de *Quercus suber*, junto con *Tomentella bryophila* (Pers.) Larsen, loc. 2, 22.XI.1985, n° 9433.

Cuerpo fructífero resupinado y fácilmente separable del sustrato, de color marrón-ferruginoso y de superficie granulosa. Subiculo concoloro y con abundantes cordones miceliales.

Sistema de hifas monomitico. Hifas del subiculo fibuladas de hasta 4μm de diámetro y de color amarillo-marrón, (Fig. 8-9). Hifas del subhimenio de paredes finas y concoloras con las del subiculo. Hifas de los cordones miceliales de 1,5-3μm y fibuladas. Basidios tetraspóricos, claviformes, de 30-40(45) x



Figs. 12-17 - *Vuilleminia cystidiata* Parm., cistidios, basidios y esporas (n° 9997).

6-7μm, con esterigmas de hasta 5μm de longitud. Esporas esférico-lobuladas, de 6-8μm de diámetro, espinosas y amarillentas (Fig. 10).

Observaciones. Especie lignícola, ubiquista y cosmopolita según se desprende de los estudios de Larsen (1974) y Jülich & Stalpers (1980).

No citada en España.

Tubulicium vermiferum (H. Bourdot) Oberw. ex Jülich

En leño de *Arbutus unedo*, loc. 8, 14.XI.1986, n° 9893, 9934.

Citado de Vizcaya como *Tubulicrinis vermifer* (H. Bourdot) Christ. por Tellería & Navarro (1980), pero quizás mejor ubicada en el género *Tubulicium* por sus esporas vermiformes y base cistidial muy ramificada, en contraposición con las esporas de morfología variable (no vermiformes) y la base de los cistidios bifurcados del género *Tubulicrinis*.

Tubulicrinis calothrix (Pat.) Donk

En *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia*, loc. 8, 24.X.1986, n°9820, 9851 y 9852.

Vuilleminia cystidiata Parm., *Eesti NSV Tead. Akad. Toimet., Biol. Seer.* 14: 232 (1965)

En rama muerta de *Arbutus unedo*, loc. 8, 17.V.1986, n° 9631. Ibidem, 13.III.1987, n° 9997.

Basidiocarpo anual, resupinado, efuso, de consistencia cérea o algo gelatinosa, desarrollándose en leño y por debajo de la corteza. Superficie himenial lisa de color blanco-crema. Margen delimitado y blanquecino.

Sistema de hifas monomítico, formado por hifas muy entrecruzadas de 1,5-3μm de diámetro y abundantes incrustaciones. Cistidios fusiformes, de 65-85(100) x 6-8μm, emergentes del himenio, (Fig. 12-15). Dendrófisis nodulosas, de 1-2μm de diámetro, poco ramificadas y con abundantes incrustaciones. Basidios claviformes, sinuosos, de 65-75 x 2-2,5μm y con 4 esterigmas corniformes, de 7-9 x 2-2,5μm (Fig. 16). Esporas cilíndrico-alantoides, de 12-16 x 3,5-4,5μm y no amiloides, (Fig. 17).

Observaciones. Difiere fundamentalmente de *Vuilleminia comedens* Nees: Fr. y de *V. megalospora* Bres. por la ausencia de cistidios en estas últimas.

Estas citas junto con las de I. Salcedo (Alava) son las primeras para España (Tellería, com. pers.).

AGRADECIMIENTOS

Nuestra más sincera gratitud a los Drs L. Ryvarden y M.J. Larsen por las determinaciones de *Antrodia malicola* y *Tomentella punicea* respectivamente. A la Dr. M.T. Tellería, por ratificar las nuevas citas para España. Finalmente, agradecemos a la Dirección General del Medio Ambiente (Junta de Extremadura) su apoyo económico para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

BELMONTE M.D., 1986 - Estudio de la flora y vegetación de la comarca y Sierra de las Corchuelas. Parque Natural de Monfragüe. Tesis doctoral, Càceres, Universidad Complutense de Madrid, (inéd.).

BURDSALL H., 1985 - A Contribution to the Taxonomy of the genus *Phanerochaete*. *Mycologia Mem.* 10: 1-165.

DUEÑAS M., 1986 - Catálogo comentado de los Aphyllophorales del norte de España. Asturias, oeste de Cantabria y norte de León y Palencia. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

ERIKSSON J., HJORTSTAM K. and RYVARDEN L., 1981 - *The Corticiaceae of North Europe.* Vol. 6. Oslo Fungiflora: 1051-1276.

HAWKSWORTH D.L., SUTTON B.C. and AINSWORTH G.C., 1983 - *Ainsworth & Bisby's. Dictionary of the fungi,* 7th ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 445p.

HEIM R., FONT-QUER P. et CODINA J., 1934 - Fungi iberici. Observations sur la Flore Mycologique Catalane. *Treb. Mus. Ci. Nat. Barcelona, Ser. Bot.*, 15: 1-146.

HJORTSTAM K., TELLERÍA M.T., RYVARDEN L. and CALONGE F.D., 1981 - Notes on the *Aphyllophorales* of Spain II. *Nova Hedwigia* 34: 525-538.

JULICH W. and STALPERS J.A., 1980 - The resupinate non-poroid *Aphyllophorales* of the temperate northern hemisphere. *Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Afd. Natuurk., Tweede Sect.* 74: 1-335.

LARSEN M.J., 1974 - A contribution to the taxonomy of the genus *Tomentella. Mycological Mem.* 4: 1-145.

LINDSEY J.P. and GILBERTSON R.L., 1978 - Basidiomycetes that decay aspen in North America. Vaduz, J. Cramer. *Bibliotheca Mycologica* 63, 406p.

MALENÇON G. et BERTAULT R., 1971 - Champignons de la Péninsule Ibérique. I. Explorations entre le Midi valencien et le Montseny. *Acta Phytotax. Barcinon.* 8: 5-97.

MANJÒN J.L. y MORENO G., 1982 - Estudios sobre *Aphyllophorales*. II. Fructificaciones sobre *Pinus*. *Anales Jard. Bot. Madrid* 38: 333-342.

MAUBLANC M.A., 1936 - Rapport sur la session générale de la Société Mycologique de France, tenue à Barcelona du 19 au 27 octobre 1935. *Bull. Soc. Mycol. France* 52: 17-32.

MORENO G. y ESTEVE-RAVENTÓS F., Estudios micológicos en el Parque Natural de Monfragüe (Extremadura, España) I. Agaricales. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 12: 67-83.

POU V. y TELLERÍA M.T., 1985 - Notas sobre algunos *Aphyllophorales* abulenses. *Bol. Soc. Micol. Castellana* 9: 65-72.

REID D.A., 1965 - May Fungi in Portugal. *Revista Biol. (Lisboa)* 5: 135-138.

SALCEDO I. y TELLERÍA M.T., 1986 - Fragmenta chorologica occidentalia. *Anales Jard. Bot. Madrid* 42: 501-504.

TELLERÍA M.T., 1980 - Contribución al estudio de los *Aphyllophorales* españoles. Vaduz, J. Cramer. *Bibliotheca Mycologica* 74: 1-464.

TELLERÍA M.T. y NAVARRO C., 1980 - Contribución al estudio de los *Aphyllophorales (Basidiomycetes)*, de los encinares del *Lauro-Quercetum ilicis* del País Vasco. *Bol. Soc. Micol. Castellana* 5: 6-23.

Cryptogamie, Mycol., 1989, 10 (3): 227-242

AUREOBASIDIUM PULLULANS: BILAN MORPHOLOGIQUE, MÉTABOLIQUE ET ÉNERGÉTIQUE

P. PAPON*, L. SIMON* et C. CAYE-VAUGIEN**

* Laboratoire de Biologie et Cytophysiologie végétales, Fac. des Sciences, 2, rue de la Houssinière, Université de Nantes, F-44072 Nantes Cedex 03
** Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, 2, rue de la Houssinière, Université de Nantes, F-44072 Nantes Cedex 03.

RÉSUMÉ - Cinq milieux de culture de composition variée (avec ou sans phosphore et azote organique) ont été étudiés; ils induisent des voies morphogénétiques différentes chez *Aureobasidium pullulans* (L.C.P. 87.43). Les phénomènes énergétiques (mesurés par les teneurs intracellulaires en ATP et polyphosphates), les valeurs du pH (corrélées à la consommation de l'azote organique ou inorganique) et la consommation du glucose sont des facteurs qui influencent la morphogenèse vers l'état unicellulaire ou hyphal. Les formes de résistance (chlamydospores et cellules renflées), induites par une acidification rapide du milieu de culture et par une absorption plus lente du glucose extracellulaire, sont consommatrices d'ATP et de polyphosphates pendant les premiers jours de la croissance et de la consommation de l'azote ammoniacal. Les formes hyphales, induites par une source d'azote organique et par une alcalinisation du milieu de culture, sont fortement consommatrices d'ATP et de polyphosphates pendant les 24 premières heures de la croissance exponentielle, puis productrices d'ATP pendant les jours suivants.

ABSTRACT - Five various composition culture media (with or without phosphorus and organic nitrogen) are described inducing different morphogenetic development in *Aureobasidium pullulans* (L.C.P. 87.43). Energetic phenomenons (as measured by intracellular ATP and polyphosphate contents), pH values correlated to organic or inorganic nitrogen uptake, and glucose consumption are factors that influence either cellular or filamentous development. Resting cellular forms (chlamydospores and swollen cells), induced by a rapid acidification of the culture medium and by an extracellular glucose excess, are ATP and polyphosphate energy consumers for the first days culture during growth and ammonium nitrogen consumption. Hyphal forms, induced by organic nitrogen source and basidification of the culture medium, are high energy consumers for the 24h culture of the exponential growth but energy producers (ATP) the next days.

MOTS CLÉS : *Aureobasidium pullulans*, polymorphisme, morphogenèse, cellules levuriformes, hyphes, cellules renflées, chlamydospores, métabolisme fongique, ATP, polyphosphates.

INTRODUCTION

Dans les différents substrats végétaux (Taylor & Shanor, 1945; Kockova-Kratochvilova & Petrova, 1959; Jensen, 1960; Kendrick & Borges, 1962; Pugh & Buckley, 1971; Froidevaux, 1975; Jungova & Minarik, 1986) ou animaux (Winne & Gott, 1956; Hermanides-Nijhof, 1977; Salkin & al., 1986), superficiels ou profonds (Caretta, 1961; Luginbuehl & al., 1979; Luginbuehl & Muller, 1980; Verces & al., 1982), où a été isolé le micromycète *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud les formes de colonisation n'ont pas été rigoureusement observées, bien qu'il soit connu que cet agent puisse développer, en rapport avec le milieu où il croît, divers types morphogénétiques (blastospores, cellules renflées, chlamydospores, mycélium vrai, pseudomycélium) (Luteraan, 1954a, b; Bartnicki-Garcia, 1973; Kockova-Kratochvilova & al., 1980; Park, 1982). Les recherches effectuées par divers chercheurs sur des milieux stériles, conditionnés, ont montré que les facteurs nutritionnels (sucres, azote organique ou minéral) devaient contrôler le développement de la morphogenèse de ce microorganisme (Luteraan, 1954b; Gadd & Cooper, 1984; Cooper & Gadd, 1984; Cooper & al., 1985). En 1977, Sevilla & al. ont mis en parallèle l'apparition de formes déterminées, en culture, et la nature de la source carbonée et aminée; ils ont suggéré, en particulier, que la présence d'amidon comme seule source de carbone, et de la cystéine, méthionine ou phénylalanine comme seule source d'azote sont concomitantes de la production d'un mycélium en culture liquide agitée. Park (1982) a obtenu la production régulière de mycélium, mais en proportion différente, dans 16 milieux solides comportant 16 amino-acides différents comme sources d'azote organique. Ces recherches reprises par Cooper & Gadd (1984) ont montré que la transition forme lévurienne forme hyphale est globalement en rapport avec la nature organique de la source azotée consommée par le microorganisme. D'autres auteurs (Bermejo & al., 1981a) ont encore étudié l'influence de la source azotée sur la transition cellule lévurienne chlamydospore, mais de nombreuses incertitudes demeurent concernant l'origine et l'évolution des différentes formes en culture. Coexistent-elles lors de l'épuisement des différents facteurs nutritionnels du milieu?

Notre étude élargit le domaine d'investigations des auteurs précédents: elle prend en compte l'apparition, le devenir et les proportions respectives des différentes populations morphologiques d'une culture, en fonction du temps, du pH et de la composition du milieu. Cinq types de milieux ont été étudiés différant respectivement par les quantités des sources phosphorée et azotée ou par la nature de la source azotée; parallèlement au suivi métabolique de ces cultures, nous avons procédé à leur étude énergétique: évolution des polyphosphates et de l'ATP intracellulaires. Ces recherches nous ont permis d'établir le bilan global du comportement de ce microorganisme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La morphogenèse, la croissance et le développement de *A. pullulans* ont été suivis durant une douzaine de jours sur des cultures d'une souche (L.C.P. 87.43; ex $Cypp_{14}$) isolée dans le vignoble nantais (Poulard, 1979; Simon & Poulard, 1979); les cultures, antérieurement entretenues sur milieu solide de Sabouraud, ont été effectuées, à 27°C, dans des fioles d'erlenmeyer de 500ml contenant

150ml du milieu nutritif autoclavé, ajusté à pH 6,8, en aérobiose (agitation de 90 va-et-vient par mn); elles ont toujours été précédées d'une préculture de 8h en milieu liquide dépourvu de phosphates (milieu XV-OP) dont un aliquot était prélevé de manière à obtenir une population sporale finale de 5.10^4 cellules. ml^{-1} dans les cultures définitives; ces caractéristiques préparaient les conditions d'activité biologique maximale des cellules mises en expérience et permettaient aussi, selon Liss & Langen (1960), d'accroître rapidement le taux des polyphosphates intracellulaires par dérepression de la polyphosphate-kinase.

Cinq types de milieux de culture ont été étudiés; ils contenaient tous du glucose (166,6mM) et des sels minéraux : $MgCl_2$. $6H_2O$ (2,5mM), $CaCl_2$ (0,265mM), $FeSO_4$. $7H_2O$ (0,013mM). Les autres constituants étaient en quantités variables (Tabl. I). Le milieu XV-Y contenait, en plus, 1% d'extrait de levure (Difco).

Tableau I: teneurs en phosphates et sulfate des différents milieux
Table I: phosphate and sulfate concentration in the various media.

	Constituants		
Milieux	K_2HPO_4	KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$
XV-OP	-	-	7,6mM
XV-P	5,7mM	7,3mM	7,6mM
XV-P_1	30,0mM	20,0mM	7,6mM
XV-P_2	30,0mM	20,0mM	39,4mM
XV-P_3	30,0mM	20,0mM	78,7mM
XV-Y	30,0mM	20,0mM	7,6mM

Tableau II: teneurs en polyphosphates cellulaires acido-soluble et acido-insoluble (exprimées en mg de $P.g^{-1}$ de matière sèche).

Table II: acido-soluble and acido-insoluble cellular polyphosphate amount (expressed as $mg.P.g^{-1}$ dry matter).

	MILIEUX			
Age des échantillons	XV-OP	XV-P	XV-P1	XV-Y
24 H	-	1,409	3,052	1,159
48 H	1,324	0,190	2,092	0,218
6 J	0,623	0,232	1,152	0,097

Mesure de la croissance et de l'activité métabolique

Le dénombrement des 4 types de population (conidies, cellules renflées, chlamydospores, mycélium) a été réalisé au compte-cellule de Malassez.

La consommation du glucose extracellulaire a été déterminée par la méthode enzymatique de Bergmeyer & al. (1974). La disparition de l'azote ammoniacal extracellulaire a été suivie par dosage colorimétrique (réactif de Nessler) des surnageants obtenus après centrifugation à 2000 tours pendant 10mn. Après

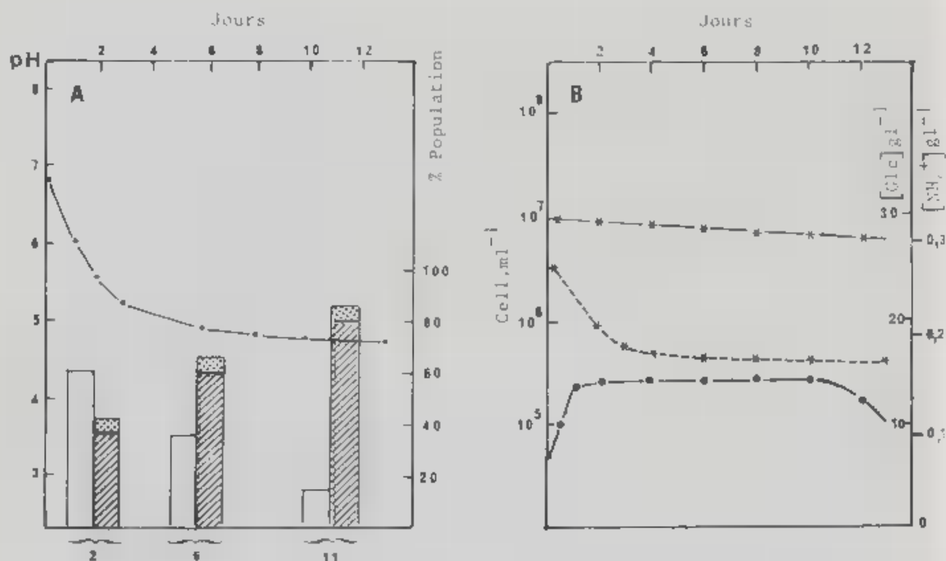


Figure 1

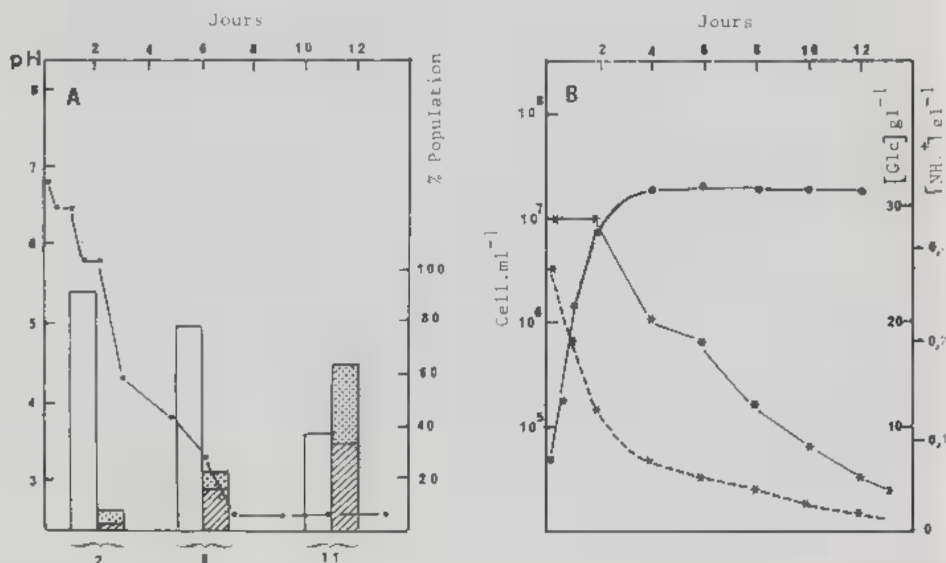


Figure 2

- conidies
- ∅ renflées
- chlamydospores

- croissance
- glucose
- NH_4^+

incubation de 12, 24h et 6 jours les cellules ont été centrifugées et récoltées pour l'extraction des polyphosphates réalisée selon la méthode de Mudd & al. (1958); le dosage a été effectué par la méthode microcolorimétrique de Fiske & Subbarow (1925) modifiée par Taussky & Shorr (1953); les poids de matières sèches ont été déterminés à partir de 10ml de culture.

Les teneur en ATP cellulaire ont été suivies au cours de la croissance des populations des milieux XV-OP, XV-P, XV-P_1 et XV-Y par la technique de bioluminescence utilisant les propriétés de l'enzyme, luciférase, et de son substrat, la luciférine; les mesures ont été effectuées au biocounter 2010 de chez Lumac après 60 secondes d'action du DMSO et dilution dans un tampon Tris-acétate 20mM ajusté à pH 7,6.

Les cultures ont été régulièrement suivies pendant 12 ou 14 jours sauf pour les recherches d'ATP suspendues au bout de 6 ou [redacted] jours.

RÉSULTATS

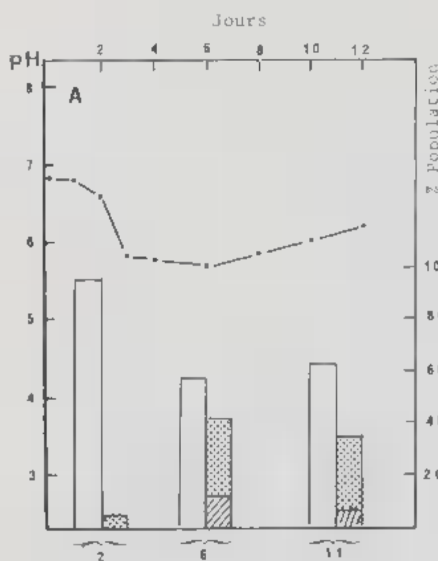
Ils seront exposés en commençant par le milieu nutritif le plus défavorable à la croissance, puis en suivant les conditions permettant d'accéder au meilleur développement et croissance du microorganisme.

Milieu XV-OP

Dans ce milieu, la population est essentiellement de nature unicellulaire; la croissance est faible, atteignant seulement 3.10^5 cellules. ml^{-1} après une phase exponentielle peu importante, d'une durée de 24h au cours de laquelle le pH extracellulaire chute de 1,2 unités; il atteindra 4,8 unités au bout d'une huitaine de jours de culture (Fig. 1A). Le pourcentage des cellules renflées par rapport à l'ensemble de la population se maintient constamment autour de 5% tandis que celui des chlamydospores augmente très rapidement dans le milieu: de 35% de la population au 2ème jour de culture (lorsque le pH est de 5,5), il atteint 60% au 6ème jour, puis 80% au 11ème jour de culture (Fig. 1A). En rapport avec la faible croissance de la population cellulaire, l'assimilation du glucose est négligeable: 5,6% seulement du glucose disponible ont été absorbés en 14 jours de culture (Fig. 1B). Bien que peu importante, la période de plus forte assimilation de l'azote ammoniacal correspond à la phase de croissance exponentielle (Fig. 1B).

Fig. 1 - Milieu XV-OP. Fig. 2 - Milieu XV-P. (A) Histogrammes des différentes formes exprimées en culture et évolution du pH extracellulaire. (B) Cinétique de croissance et évolution des teneurs en glucose et en azote.

Fig. 1 - XV-OP medium. Fig. 2 - XV-P medium. (A) Histograms of the various forms in culture and extracellular pH evolution. (B) Population growth and evolution of glucose and nitrogen concentrations.



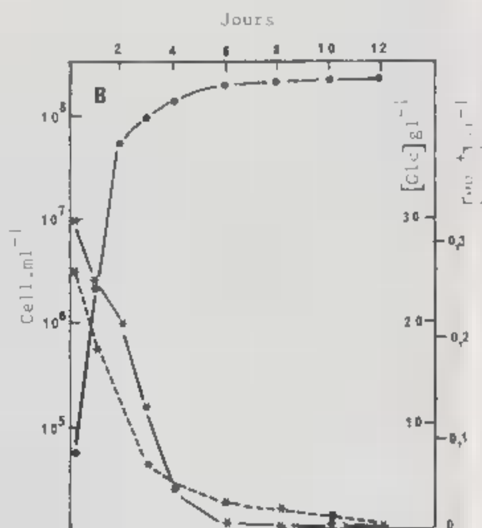
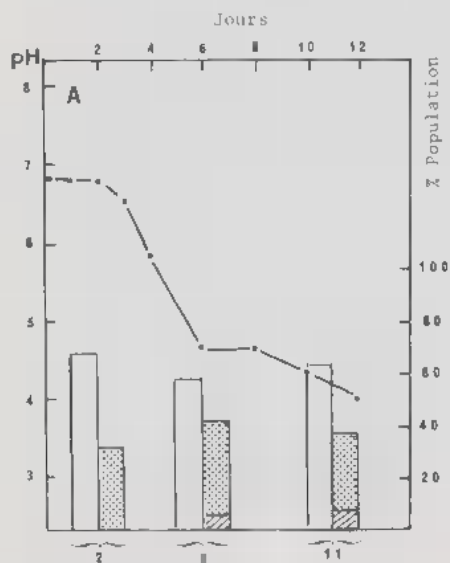


Figure 3



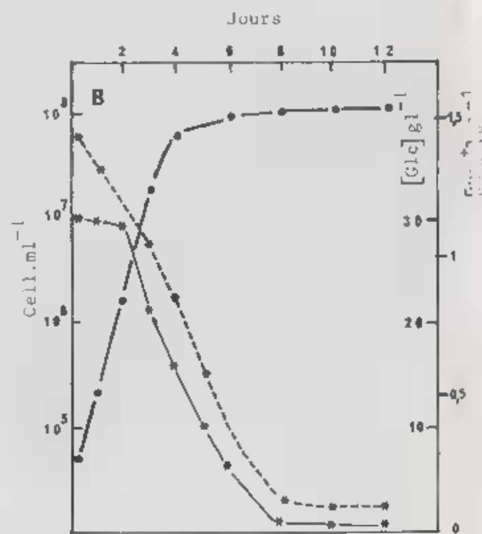


Figure 4

conidies

∅ renflées

chlamydospores

croissance

glucose

NH_4^+

Le contenu intracellulaire en polyphosphates diminue fortement du 2ème au 6ème jour de culture pour atteindre 0,6mg de phosphore par gramme de matière sèche. (Tabl. II). La teneur en ATP intracellulaire (Fig. 7) chute très légèrement après ensemencement, puis oscille autour d'une valeur moyenne de $3,31.10^{-6}$ nmoles par cellule.

Milieu XV-P

A la fin de la phase exponentielle de croissance, d'une durée de 3 jours, la population atteint 2.10^7 cellules.ml^{-1}. La croissance demeure ensuite stationnaire jusqu'au 12ème jour de culture à partir duquel s'amorce l'autolyse cellulaire. Pendant les 7 premiers jours de culture, le pH chute régulièrement jusqu'à 2,5 (Fig. 2A). Les premières observations de cellules renflées et de chlamydospores (2% de la population) peuvent être effectuées dans des cultures de 48h (Fig. 2A) quand le pH extracellulaire atteint 4,8; parallèlement à la chute régulière du pH, s'accroissent les pourcentages des cellules renflées et des chlamydospores dans le milieu (15% au bout de 6 jours; 33% au bout de 11 jours).

Le taux de glucose extracellulaire reste constant pendant 48h puis décroît régulièrement (Fig. 2B) pendant 13 jours (87,3% du glucose initial); l'azote ammoniacal est très rapidement absorbé pendant la phase exponentielle de croissance (60% de l'azote disponible a disparu au bout de 72h), puis l'absorption est ralentie, pour être totalement achevée au bout de 13 jours de culture (Fig. 2B). Le contenu en polyphosphates intracellulaires décroît jusqu'à 0,2mg de phosphore.g^{-1} de matière sèche (Tabl. II). Les teneurs en ATP intracellulaire (Fig. 7) décroissent pendant les 3 premiers jours de culture correspondant à la période de plus forte assimilation de l'azote et d'acidification du milieu, puis augmentent et se maintiennent autour d'une valeur moyenne de 1.10^{-7} nmole par cellule. Une bonne corrélation ($r = -0,81$) s'établit entre les variations du pH (y) et le prélèvement du glucose (x) pendant les 14 jours de culture, selon l'équation de la droite de régression : $y = -0,82x + 5,12$.

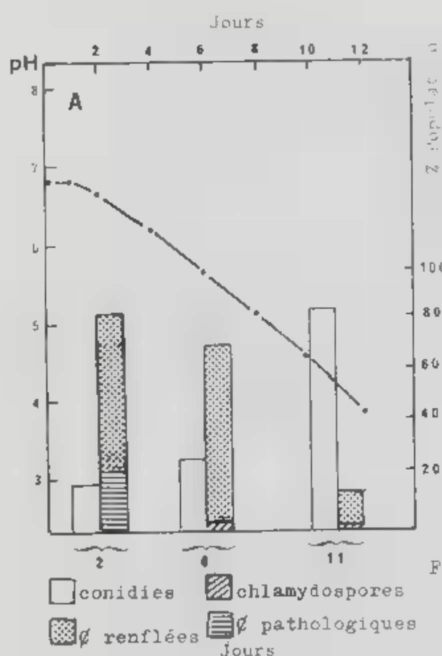
Milieu XV-P1

La croissance de la population est importante et atteint 5.10^7 cellules.ml^{-1} de culture en fin de phase exponentielle d'une durée de 48h. On observe 5% de cellules renflées au 2ème jour de culture, mais ce pourcentage s'accroît notablement le 6ème jour (30%) quand le pH atteint sa valeur minimale 5,7; la proportion des chlamydospores demeure toujours inférieure à celle des cellules renflées, mais on note une légère régression de ces populations durant la période

---

Fig. 3 - Milieu XV-P_1. Fig. 4 - Milieu XV-P_2. (A) Histogrammes des différentes formes exprimées en culture et évolution du pH extracellulaire. (B) Cinétique de croissance et évolution des teneurs en glucose et en azote.

Fig. 3 - XV-P_1 medium. Fig. 4 - XV-P_2 medium. (A) Histograms of the various forms in culture and extracellular pH evolution. (B) Population growth and evolution of glucose and nitrogen concentrations.



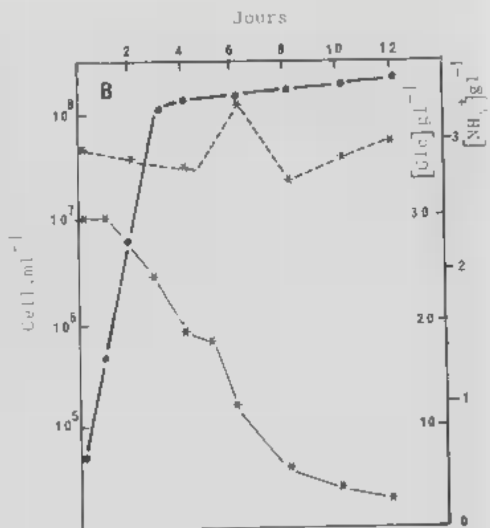
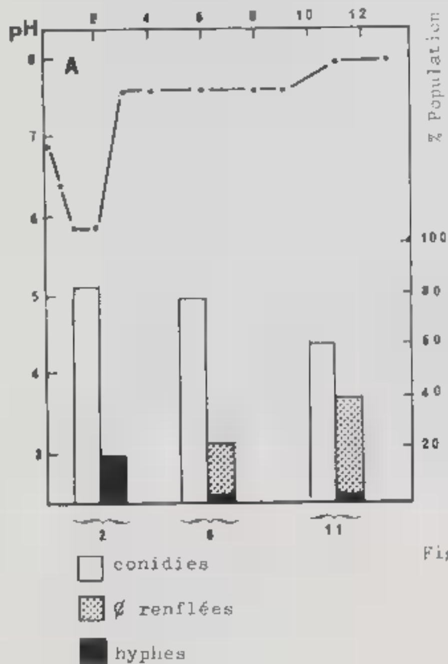


Figure 5



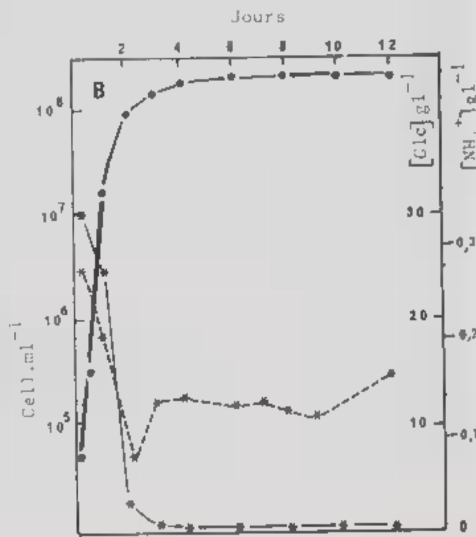


Figure 6

●——● croissance
■——* glucose
- - - NH$_4^+$

d'alcalinisation du milieu tandis que le pourcentage de conidies augmente (Fig. 3A).

La consommation du glucose extracellulaire est importante pendant les 6 premiers jours de culture (97,3% du glucose initial); pendant cette période le pH (y) est étroitement corrélé à cette consommation ($y = -0,29x + 6,8$; coefficient: r = - 0,99). Après un temps de latence de 12h, l'azote ammoniacal est consommé de façon très rapide (75% au cours des 3 premiers jours) puis lente, les conditions devenant limitantes en $(NH_4)_2SO_4$ (Fig. 3B). Le contenu en polyphosphates décroît de 3,052 à 1,152mg de phosphore.g^{-1} de matière sèche. Les teneurs en ATP cellulaire (Fig. 7) diminuent très rapidement pendant la phase de croissance exponentielle, puis plus lentement pendant les 4 jours suivants.

Milieu XV-P2

La croissance de la population est importante, mais la période de croissance exponentielle s'établit plus lentement que dans les milieux précédents (72h); la population atteint 3.10^7 cellules. ml^{-1}. La présence de quelques cellules hypertrophiées, pathologiques, traduit une certaine toxicité du milieu. On observe une forte proportion (30%) de cellules renflées dès le 2ème jour de culture, quand le pH est de 6,8 unités; le pourcentage des cellules conidiennes est moins élevé que dans les milieux XV-P et XV-P_1. La proportion des chlamydospores est également plus faible que dans les milieux précédents; elles apparaissent quand la valeur du pH est voisine de 5 (Fig. 4A).

Huit jours seulement sont nécessaires pour l'épuisement du glucose du milieu (Fig. 4B). A la fin de la phase exponentielle de croissance, il reste encore dans le milieu les 3/5ème de la source d'azote ammoniacal (14 jours sont nécessaires à son épuisement).

Milieu XV-P3

La population importante atteint 10^8 cellules. ml^{-1} de milieu (Fig. 5B) au bout de 72h mais, le 2ème jour de culture, elle est déjà en partie composée de cellules hypertrophiées, pathologiques (22%), la population conidienne est faible (18%) et celle des cellules renflées atteint 60%; cette inversion du rapport des formes cellulaires, comparativement à celui des milieux XV-P et XV-P_1, confirme le caractère toxique du milieu enrichi en $(NH_4)_2$ SO_4. Cependant après 72h de culture (Fig. 5B) on observe une augmentation de la population conidienne qui atteint 84% au bout de 11 jours de culture (Fig. 5A), attestant ainsi de la

---

Fig. 5 - Milieu XV-P_3. Fig. 6 - Milieu XV-Y. (A) Histogrammes des différentes formes exprimées en culture et évolution du pH extracellulaire. (B) Cinétique de croissance et évolution des teneurs en glucose et en azote.

Fig. 5 - XV-P_3 medium. Fig. 6 - XV-Y medium. (A) Histograms of the various forms in culture and extracellular pH evolution. (B) Population growth and evolution of glucose and nitrogen concentrations.

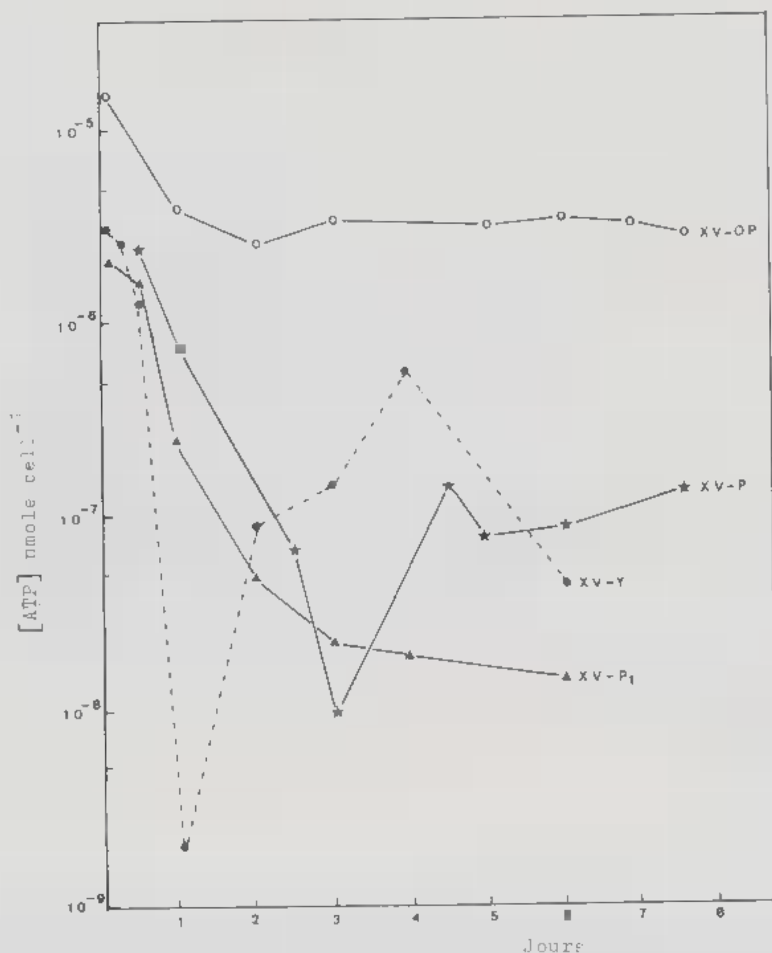


Fig. 7 - Évolution des teneurs en ATP intracellulaire au cours de la croissance.

Fig. 7 - Evolution of intracellular ATP amounts during growth.

détoxification du milieu par le microorganisme. La population atteint 4.10^8 cellules. ml^{-1} au bout de 12 jours. Le pourcentage de chlamydospores est faible au bout de 6 jours de culture et diminue encore au bout de 12 jours malgré un pH qui s'est régulièrement acidifié. La consommation du glucose extracellulaire n'est pas totale (Fig. 5B) au bout de 12 jours et la teneur en azote ammoniacal reste toujours très élevée dans le milieu où semble se produire des vagues de libération de l'ion ammonium par le microorganisme.

Milieu XV-Yeast

La croissance, très importante, atteint 2.10^8 cellules. ml^{-1}, après une phase exponentielle plus rapide que dans les autres milieux de culture; la population est constituée de conidies et d'hyphes (18%) (Fig. 6A), la biomasse mycélienne montre un accroissement jusqu'à 72h puis une régression (Tabl. III). Au 5ème jour 15% de cellules renflées sont apparues et atteignent 38% au 11ème jour mais les hyphes persistent pendant toute la durée de la culture; aucune chlamydospore n'a été observée. Dans ce milieu où la quantité totale d'azote (minérale et organique) est égale à celle du milieu XV-P_2, certaines formes sont identiques (conidies et cellules renflées) mais en proportions inégales (Fig. 6A), d'autres sont différentes (milieux XV-P_2: chlamydospores: milieu XV-Y: hyphes). Contrairement aux autres milieux, la chute du pH extracellulaire (pendant 48h) est suivie d'une alcalinisation progressive du milieu (Fig. 6A) au cours de la phase stationnaire de croissance.

Tableau III: teneur en éléments mycéliens (technique de la matière sèche). Milieu XV-Y.
Table III: hyphae amount (dry matter method). XV-Y medium.

Temps	Poids sec total (g)	Poids sec des éléments mycéliens (g)	Pourcentage mycélien (%)
24 H	0,0110	0,0006	5,45
48 H	0,0234	0,0015	6,41
72 H	0,0550	0,0070	12,72
6 J	0,0950	0,0055	5,78
11 J	0,0801	0,0015	1,87

Les consommations de glucose et d'azote minéral sont très rapides pendant les 2 premiers jours dénotant les conditions favorables de la culture (Fig. 6B): 90,6% du glucose est prélevé en 48h par l'ensemble de la population; le pH (y) du milieu est corrélé à la consommation du glucose et à celle de NH_4^+, selon les équations des droites de régression : $y = -0,24x$ (glc) $+ 6,49$ ($r = -0,83$) et $y = -10,14x$ (NH_4^+) $+ 6,70$ ($r = -0,86$).

Au delà de 48h, pendant la phase stationnaire, les teneurs en azote ammoniacal varient peu en rapport avec la consommation préférentielle de l'azote organique de l'extrait lévurien, dont le turn-over libérerait selon les schémas classiques, des ions NH_4^+ dans le milieu.

L'ATP cellulaire (Fig. 7) diminue brusquement pendant la période de croissance exponentielle, puis s'accroit notablement les 3 jours suivants pour diminuer ensuite jusqu'au 6ème jour de culture.

DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenu seront discutés dans 2 paragraphes distincts concernant l'un les conditions favorisant la formation des cellules de résistance (cellules renflées et chlamydospores), l'autre les conditions de la formation des hyphes; ces 2 formes dérivant de la conidie, élément de base, qui peut se développer en l'une ou l'autre par morphogenèse différentielle.

Conditions de la formation des cellules renflées et des chlamydospores

Les résultats obtenus dans les différents milieux, à l'exclusion du milieu XV-Y contenant en plus de l'azote aminé, montrent que les pourcentages des éléments de résistance sont directement liés à la chute du pH extracellulaire comme l'a montré Park (1984); le pH doit se maintenir ensuite à une valeur acide, qui peut d'ailleurs être variable suivant les milieux (4,8: milieu XV-OP; 2,5: milieu XV-P) pour permettre l'accroissement du taux de chlamydospores. Si une alcalinisation se produit (milieu XV-P_1), le taux des chlamydospores régresse. Ce ne sont pas les valeurs les plus acides qui fournissent les meilleurs pourcentages de chlamydospores (milieu XV-P). Or, comme le montrent les résultats obtenus dans les milieux XV-OP, XV-P, XV-P_2 l'acidité du milieu est directement liée à la consommation de la source d'azote inorganique mise à la disposition du microorganisme. Ces données sont connues dans le domaine nutritionnel, aussi bien chez les Thallophytes que chez les Cormophytes (How, 1940; Cochrane, 1958): le pH d'un milieu dépend de la forme azotée dont l'organisme se nourrit, il augmente par production d'ammoniaque si la nutrition s'effectue à partir de composés azotés organiques et diminue par absorption de NH_4^+; la levure *Saccharomyces cerevisiae* obéit aux mêmes lois (Peña & al., 1987).

Le milieu XV-OP, bien que non favorable au développement du microorganisme, montre que la période de croissance active qui lui permet d'atteindre une population de 3.10^5 cellules.ml^{-1} correspond rigoureusement à la période de 48h durant laquelle s'effectue une légère consommation d'ATP et de la source ammoniacale; dans ce milieu où la forme chlamydosporale prédomine dès le 6ème jour de culture, la teneur en glucose extracellulaire varie peu (5,6% du glucose total est épuisé au bout de 14 jours de culture) mais il est intéressant de remarquer que si cette valeur est rapportée à la population qui a colonisé le milieu, la quantité de glucose prélevé par cellule, au bout de 14 jours, est, en réalité, plus élevée que dans les autres milieux (XV-OP: $1,3.10^{-5}$ mg; XV-P: $9,9.10^{-8}$ mg; XV-Y: $1,2.10^{-8}$ mg). Ce processus pourrait mettre en jeu, en période stationnaire, une phosphorylation du glucose par les polyphosphates plutôt que par l'ATP dont les teneurs varient peu pendant cette phase, alors que le taux des polyphosphates ne cesse de décroître. Ceci est important car l'élément P est absent de ce milieu défavorable à la croissance et la cellule doit assurer sa propre survie; elle est consommatrice d'ATP et de polyphosphates pendant la période de dégradation de l'azote ammoniacal qu'elle utilise en partie pour la biosynthèse de son matériel cellulaire (Lagunas, 1976) puis les quantités d'ATP ne varient plus pendant la période stationnaire où apparaissent les chlamydospores. Selon Brown & al. (1973), ce sont essentiellement les parois cellulaires de la chlamydospore qui s'enrichissent en glucose, comparativement à celles des conidies et des cellules renflées; les recherches effectuées en microscopie après test de Thiery montrent que les teneurs en glycogène intracytoplasmique et en polysaccharides pariétaux périphériques sont très importantes relativement à celles des conidies et des hyphes (Simon, résultats non publiés).

Outre l'acidification du milieu régulée par la consommation de l'azote ammoniacal, le transport transmembranaire du glucose en période stationnaire pourrait influencer le pH et donc l'apparition des cellules renflées et chlamydosporales (milieu XV-P et XV-P_1); en effet, une bonne corrélation existe

entre pH et consommation du glucose dans ces milieux. Le milieu XV-P_1 se révèle intéressant à cet égard: une inversion des pentes de la courbe du pH s'effectue au bout de 6 jours lorsque le glucose est épuisé et se traduit immédiatement par une légère diminution des taux des formes de résistance. Dans un milieu de composition minérale comparable au milieu XV-P_1, Bermejo & al. (1981a, b) ont observé que des quantités croissantes de glucose, supérieures à 3%, stimulent la transition conidie-chlamydospore et que la morphogenèse chlamydosporale est régulée par le pH.

Les résultats obtenus en milieu XV-P_3 (enrichi en azote ammoniacal) permettent de préciser le rôle du métabolisme de l'azote inorganique dans la morphogenèse chlamydosporale. Dans ce milieu, l'azote ammoniacal est peu consommé et la production de chlamydospores reste très faible, diminuant encore au 6ème jour de culture; une forte proportion de cellules hypertrophiées, pathologiques, accompagne la population conidienne au 2ème jour de culture quand la consommation du glucose est encore faible, mais cette population disparait ensuite, remplacée par une population importante de cellules renflées. La lyse de la biomasse pathologique s'effectue entre le 3ème et le 6ème jour où on ne l'observe plus; cette biomasse libère son contenu cellulaire protéique qui, mis à la disposition des conidies, permet une reprise active de leur croissance et de leur métabolisme, tandis que régresse le pourcentage de cellules renflées jusqu'au 11ème jour de culture. Ces résultats permettent de penser que la cellule renflée représente bien chez *Aureobasidium pullulans* un état de "souffrance" transitoire, qui pourrait conduire suivant les conditions du milieu soit à un retour vers l'état conidie soit à une évolution plus ou moins rapide vers l'état chlamydospore.

Conditions de la formation des hyphes

En 1984, Cooper & Gadd ont montré que l'addition d'extrait de levure à la concentration de 1% dans le milieu synthétique liquide basal permet l'apparition de la forme mycélienne en culture; cependant ces auteurs n'ont pas identifié la (ou les) molécule(s) responsable(s), dans ce produit complexe, de l'induction de filaments; ils n'ont pas observé les conséquences métabolique et morphogénétique de l'utilisation de cette source d'azote organique. Les résultats que nous avons obtenus permettent d'apporter des précisions dans ce domaine et de souligner l'étroite corrélation qui existe entre la consommation de l'azote organique ou inorganique, les facteurs glucose, phosphate, ATP et pH.

Dans les différents milieux étudiés, la meilleure croissance du microorganisme est obtenue en milieu XV-Y où la source d'azote est mixte (minérale et organique); dans ce milieu, la population constituée essentiellement de conidies et d'hyphes, atteint 2.10^8 unités.ml^{-1} plus rapidement que dans les autres milieux et notamment dans les milieux XV-P_2 et XV-P_3 où la quantité d'azote (inorganique uniquement) est respectivement identique ou le double. Une chute importante du taux d'azote ammoniacal s'effectue de façon concomitante pendant la durée de la phase exponentielle de croissance (période de biosynthèses et de multiplication) mais un changement métabolique se produit ensuite: le microorganisme, ayant consommé le glucose extracellulaire et une forte proportion de l'azote inorganique du milieu, dont le taux ne varie plus ou peu, accroit sa biomasse mycélienne et devient producteur d'énergie (augmentation des teneurs en ATP

cellulaire). Ces résultats doivent être corrélés à l'abondance des mitochondries dans l'extrémité apicale des hyphes (Simon, 1984). De plus l'alcalinisation progressive du milieu nous permet de penser que le microorganisme utilise l'autre source azotée mise à sa disposition (azote organique de l'extrait de levure) libérant de l'ammoniaque qui permet l'augmentation progessive du pH. Ces résultats peuvent être corrélés à l'induction d'activités protéasiques et au transport transmembranaire des acides aminés par l'intermédiaire d'une GAP (general amino-acid permease) dont la synthèse est réprimée quand la levure se développe dans un milieu contenant NH_4^+ comme cela a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* par Grenson & al. (1970).

La consommation du glucose extracellulaire est également plus rapide dans ce milieu favorable à une croissance active et doit être mise en parallèle avec la chute de la teneur en polyphosphates totaux intracellulaires qui atteint la valeur la plus faible de tous les milieux étudiés (0,1 mg.P g r.$^{-1}$ de matière sèche); en outre nous avons vu qu'une bonne corrélation existe entre la chute du pH et la consommation du glucose pendant les premières heures de culture; Van Steveninck & al. (1986) ont proposé un modèle de transport du glucose par 2 mécanismes différents chez *Kluyveromyces marxianus*, l'un associé au métabolisme des polyphosphates de la membrane, l'autre au symport sucre/proton associé à une conversion ATP/ADP.

En conclusion, ces recherches montrent que des phénomènes métaboliques et énergétiques régulent les aspects du polymorphisme chez *A. pullulans*. L'utilisation et (ou) le transport des acides aminés seraient en jeu dans la production de la forme mycélium, de façon concomitante à l'établissement de phénomènes énergétiques: consommation des polyphosphates, consommation et production d'ATP. L'utilisation et (ou) le transport de la source carbonée seraient plutôt en jeu dans le développement de la forme cellulaire, conidienne, renflée, ou chlamydosporale. La chute du pH extracellulaire, liée à la consommation de la source d'azote inorganique est prépondérante pour le développement des formes de résistance. Des recherches devraient être entreprises, concernant les transports transmembranaires de ces métabolites chez *A. pullulans*, dont on connait la pathogénicité (Salkin & al., 1986); un tel type d'investigation a été suggéré par Prasad (1987) chez *Candida albicans*, organisme dimorphe et pathogène.

BIBLIOGRAPHIE

BARTNICKI-GARCIA S., 1973 - Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *In:* ASHWORTH J.O. & SMITH J.E., *Microbial Differentiation*. Cambridge Univ. Press: 245-267.

BERGMEYER H.U., BERNT E., SCHMIDT F. and STORK H., 1974 - Determination of glucose with hexokinase and Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In:* BERGMEYER H.U., *Methods of enzymatic analysis*. N. Y., Academic Press Inc.: 1196-1201.

BERMEJO J.M., DOMINGUEZ J.B., GONI F.M. and URUBURU F., 1981a - Influence of carbon and nitrogen sources on the transition from yeast-like cells to chlamydospores in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 47: 107-119.

BERMEJO J.M., DOMINGUEZ J.B., GONI F.M. and URUBURU F., 1981b - Influence of pH on the transition from yeast-like cells to chlamydospores in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 47: 385-392.

BROWN R.G., HANIC L.A. and HSIAO M., 1973 - Structure and chemical composition of yeast chlamydospores of *Aureobasidium pullulans*. *Canad. J. Microbiol.* 19: 163-168.

CARETTA J., 1961 - Cité par LODDER J., 1970 - *In:* The yeast, a taxonomic study. Amsterdam, North-Holland Publ. Comp.: 1385p.

COCHRANE U.W., 1958 - *Physiology of fungi*, N. Y., J. Wiley & Sons, 524 p.

COOPER L.A. and GADD G.M., 1984 - The induction of mycelial development in *Aureobasidium pullulans* (IMI 45533) by yeast extract. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 50: 249-260.

COOPER L.A., EDWARDS S.W. and GADD G.M., 1985 - Involvement of adenosine 3'-5' cyclic monophosphate in the yeast mycelial transition of *Aureobasidium pullulans*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1589-1593.

FISKE C.H. and SUBBAROW Y., 1925 - The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.

FROIDEVAUX L., 1975 - *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. An associate of *Alnus rubra* and *Lactarius obscuratus* mycorhizae. *Eur. J. Forest Pathol.* 5: 124-127.

GADD G.H. and COOPER L.A., 1984 - Strain and medium - related variability in the yeast - mycelial transition of *Aureobasidium pullulans*. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.* 23: 47-49.

GRENSON M., HOU C. and CRABEEL M., 1970 - Multiplicity of the amino-acid permeases in *Saccharomyces ceverisiae*. *J. Bacteriol.* 103: 770-777.

HERMANIDES-NIJHOF E.J., 1977 - *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 15, 141p.

HOW E.J., 1940 - The mycorhizal relations of larch. I. A study of *Boletus elegans* Schum. in pure culture. *Ann. Bot. (London)* 4: 135-140.

JENSEN M., 1960 - Experiments on the inhibition of some thermoresistant moulds in fruit juices. *Ann. Inst. Pasteur (Lille)* 11: 179-182.

JUNGOVA O. and MINARIK, 1986 - Ecology of yeast and yeast-like microorganisms of the vine. *Mitt. Klosterneuburg* 36: 67-74.

KENDRICK W.B. and BORGES A., 1962 - Biological aspects of the decay of *Pinus silvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia* 4: 313-358.

KOCKOVA-KRATOCHVILOVA A. and PETROVA M., 1959 - Yeasts and yeast-like microorganisms of the little Carpathian region. *Czechosl. Mycol. (Prague)* 13: 37-42.

KOCKOVA-KRATOCHVILOVA A., CERNAKOVA M. and SLAVIKOVA E., 1980 - Morphological changes during the life cycle of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Folia Microbiol. (Prague)* 25: 56-67.

LAGUNAS R., 1976 - Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 661-674.

LISS E. and LANGEN P., 1960 - Über ein hochmolekulares Polyphosphat der Hefe. *Biochem. Z.* 333: 193-201.

LUGINBUEHL M., PETRINI O. and MULLER E., 1979 - Endophytic fungi of wheat (*Triticum vulgare* Vuill) First result. *Phytopathol. Medit.* 18: 192-194.

LUGINBUEHL M. and MULLER E., 1980 - Untersuchungen über endophytische Pilze. II. Förderung der Samenkeimung bei *Hedera helix* durch *A. pullulans* und *Epicoccum purpurascens*. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 90: 262-267.

LUTERAAN P.J., 1954a - Influence de la forme ensemencée sur le développement et le comportement métabolique de *Pullularia pullulans* (de Bary et Low) Berkhout, en présence de nitrate de sodium. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 239: 595-597.

LUTERAAN P.J., 1954b - De quelques relations entre des modifications morphologiques et des changements métaboliques obtenus chez des champignons par la restriction en azote d'un milieu de culture plus ou moins aéré. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 239: 1406-1408.

MUDD S., YOSHIDA A. and KOIKE M., 1958 - Polyphosphate as accumulation of phosphorus and energy. *J. Bacteriol.* 75: 224-235.

PARK D., 1982 - Aminoacid nutrition and yeast mycelial dimorphism in *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79: 170-172.

PARK D., 1984 - Low pH and the development of large cells in *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82: 717-720.

PEÑA A., PABLO PARDO J. and RAMIREZ J., 1987 - Early metabolic effect and mechanism of ammonium transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 253: 431-438.

POULARD A., 1979 - Recherches sur la microflore lévurienne, fermentaire et oxydative du vignoble nantais. Thèse Doc. Université (Nantes), 194 p.

PRASAD R., 1987 - Nutrient transport in *Candida albicans*, a pathogenic yeast. *Yeast* 3: 209-221.

PUGH G.J.F. and BUCKLEY N.G., 1971 - *Aureobasidium pullulans*; and endophyte in Sycamore. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 227-231.

SALKIN I.F., MARTINEZ J.A. and KEMNA M.E., 1986 - Opportunistic infection of the spleen caused by *Aureobasidium pullulans*. *J. Clinic microbiol.* 23: 828-831.

SEVILLA M.J., ISUSI P., GUTIERREZ R., EGEA L. and URUBURU F., 1977 - The influence of carbon and nitrogen sources on the morphology of *Pullularia pullulans*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 68: 300-303.

SIMON L. et POULARD A., 1979 - Présence de l' *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud dans le vignoble nantais. Étude microbiologique et écologique. *Bull. Soc. Sci. Nat. Ouest-France*, n.s., 1: 57-68.

SIMON L., 1984 - Étude ultrastructurale des différentes régions de l'hyphe chez *Aureobasidium pullulans*. *Cryptogamie, Mycol.* 5: 323-344.

TAUSSKY B.H. and SHORR E., 1953 - A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202: 675-685.

TAYLOR C.F. and SHANOR L., 1945 - *Pullularia pullulans* storage fruit spot of tomato. *Phytopathology* 35: 210-212.

VAN STEVENINCK J., SCHUDDEMAT J. and VAN DEN BROEK P.J.A., 1986 - Métabolisme du phosphate chez les microorganismes. Symp. Intern. Concarneau, 8-13 Juin.

VERCESI A., MINERVINI G. et BISIACH M., 1982 - *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Ann. su foglie di *Vitis vinifera*. *Rivist. Patol. Veg.*, Ser. 4, 18: 77-81.

WINNE E.S. and GOTT C.L., 1956 - A proposed revision of the genus *Pullularia*. *J. Gen. Microbiol.* 14: 512-519.

Cryptogamie, Mycol. 1989, 10 (3): 243-256

LA PRÉMUNITION DE LA TOMATE CONTRE LA VERTICILLIOSE CAUSÉE PAR *VERTICILLIUM ALBO-ATRUM*, FORME A MICROSCLÉROTES. CONSÉQUENCES PHYSIOLOGIQUES DU PHÉNOMÈNE

A. REGRAGUI, H. LAHLOU et H. ZAID

Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences de Rabat,
Université Mohamed V. Maroc

RÉSUMÉ - La préinoculation des plants de tomate var. Marmande, avec des mutants non pathogènes du *Verticillium albo-atrum* (obtenus au laboratoire soit après vieillissement d'une culture de l'isolat p3, soit après plusieurs passages successifs sur une plante non hôte), a permis de les protéger contre l'agressivité de l'isolat p3. Toutefois, les agents prémunisants ne sont efficaces que s'ils sont appliqués 2 jours avant l'inoculation par la souche pathogène. Pour une bonne prémunition, la densité de l'inoculum doux doit être égale ou supérieure à 10^6 spores/ml. La protection semble être associée à un retard dans la colonisation de l'ensemble de la tige par l'agent pathogène. Les effets de la souche pathogène de *V. albo-atrum* sur la nutrition minérale et azotée des plantes infectées (altération dans l'accumulation des ions K^+ et Na^+, réduction de l'activité nitrate réductase) sont moins marqués chez les plantes prémunies. La préinoculation semble déclencher chez les plantes hôtes un système de défense(s) dont les conséquences sur le plan nutritionnel sont discutées.

ABSTRACT - The preinoculation of tomato plants var. Marmande with avirulent mutants of *V. albo-atrum* (obtained in laboratory either after the aging of the p3 isolate culture or after several successive trials on a non host plant) has allowed to protect them against the p3 aggression. However, the premunity factors are only efficient if applied 2 days before the challenger inoculation. For a good premunity, the mild inoculum density to be used must be equal or superior to 10^6 spores/ml. The protection seems to be associated with a delay in the spread of the total stem by the challenger. The effects of the pathogen strain of the *V. albo-atrum* on the mineral and nitrogenized nutrition of the infected plants (alteration in ions K^+ and Na^+ accumulation, reduction of nitrate reductase activity) have less impact on premunited plants. Preinoculation seems to activate in host plants a defense system for which the consequences on the nutrition domain have been discussed.

MOTS CLÉS : prémunition, *Verticillium*, composition minérale, activité nitrate réductase.

INTRODUCTION

De nombreuses recherches ont permis de montrer que les plantes peuvent être prémunies contre les parasites phytopathogènes (David, 1968; Kuc & al., 1975; Mas & Molot, 1977...). L'hôte sensible à l'agent pathogène est préinoculé avec un organisme peu ou pas pathogène, qui induit la résistance de l'hôte contre une infection ultérieure. La prémunition des plantes contre l'agressivité du *Verticillium* a donné des résultats positifs: retard dans l'apparition des symptômes de la maladie et réduction du nombre de plantes malades. Ainsi Schnathorst & Mathre (1966) ont pu protéger les plants de coton contre le *V. albo-atrum* par des conidies de souches avirulentes du même champignon. La préinoculation avec des conidies du *V. nigrescens* a protégé les plantes de menthe contre le *V. dahliae* (Mellouk & Horner, 1975). Matta & Garibaldi (1977) ont utilisé d'autres champignons pour protéger la tomate contre le *V. dahliae*. De son côté, Marois (1982) a pu protéger l'aubergine contre le même parasite par des isolats de *Talaromyces flavus*.

Lahlou (1983) a montré que dans la descendance par microconidies de cultures âgées de *V. albo-atrum*, forme à microsclérotes, il apparait parfois des lignées peu pathogènes vis-à-vis de la tomate Marmande. Elles pénètrent dans la plante et provoquent des symptômes peu prononcés. Selon le même auteur, ces lignées pourraient être utilisées pour tenter de prémunir les tomates contre l'attaque par des lignées plus pathogènes.

En fonction de ces données, nous avons tenté d'une part, d'optimiser les conditions de la prémunition de la tomate contre l'agressivité de la souche marocaine de *V. albo-atrum* et d'autre part, d'effectuer une première analyse des conséquences du phénomène sur la nutrition minérale et azotée des plantes inoculées, partant des observations faites par Guerrier & al. (1985), sur les perturbations nutritionnelles engendrées par la présence du *Verticillium* chez les plantes hôtes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le parasite

Différents isolats appartenant à l'espèce *V. albo-atrum*, forme à microsclérotes, ont été utilisés:

- l'isolat p3 obtenu en 1978 à partir d'une tige de tomate atteinte de verticilliose au Maroc dans la région de Casablanca, produit des microsclérotes en grande quantité et se montre très agressif vis-à-vis de la tomate Marmande.

- des mutants peu ou pas pathogènes, issus de l'isolat p3 et obtenus soit après vieillissement d'une culture p3 pour le clone p1, soit après plusieurs passages successifs sur une plante non hôte (piment) pour les clones a3 et a4 devenus peu pathogènes vis-à-vis de la plante hôte d'origine (Douira & Lahlou, 1989).

Isolats et mutants sont entretenus en culture sur milieu P.D.A. Les cultures sont conduites en boîtes de Petri, à l'obscurité et une température de 25 ± 1°C.

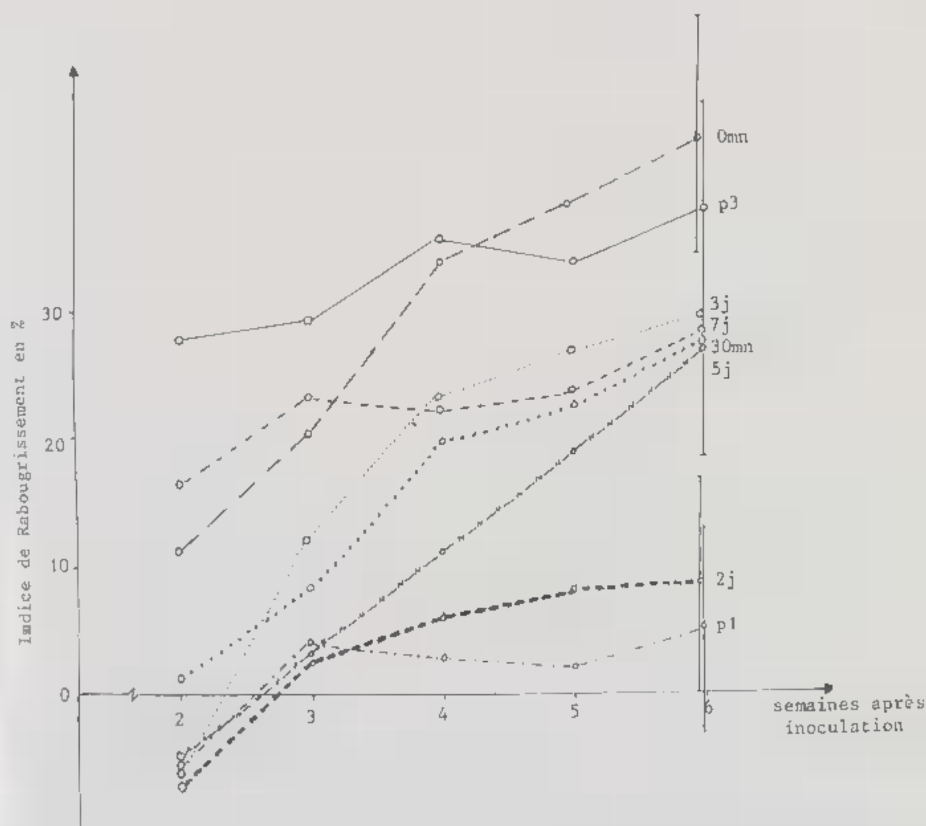


Fig. 1 - Influence de la durée de préinoculation sur l'évolution des indices de rabougrissement (IR) des plantes de tomate préinoculées avec la souche non pathogène de *V. albo-atrum* p1 avant l'inoculation avec la souche pathogène p3. Durée de préinoculation: 0, 30mn, 2, 3, 5 et 7 jours. p1: inoculation avec la souche non pathogène p1, p3: inoculation avec la souche pathogène p3.

Fig. 1 - Evolution of dwarfing index (IR) of tomato plants which had been pre-inoculated with a non pathogen strain of *V. albo-atrum* p1 in relation to the time between pretreatment and challenge inoculation. Preinoculation duration: 0, 30mn, 2, 3, 5 and 7 days. p1: inoculation with a non pathogen strain p1, p3: inoculation with a pathogen strain p3.

L'hôte, préinoculation et inoculation, culture

Les plants de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) variété Marmande, sensible au *V. albo-atrum*, âgés de 3 semaines et arrivés au stade premier bouquet de vraies feuilles sont préinoculés avec une suspension de microconidies (10^6 spores/ml) récoltées par lavage de thalles âgés de 4 jours. Les racines des plants sont trempées pendant 15mn dans l'inoculum préparé à partir de l'une des sou-

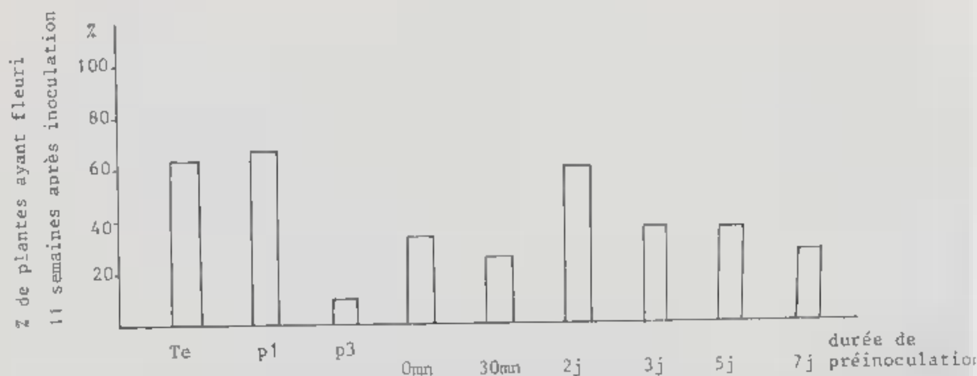


Fig. 2 - Influence de la durée de préinoculation sur la floraison des plantes de tomate prétraitées par la souche non pathogène de *V. albo-atrum* p1 avant l'infection par la souche pathogène p3. Te: témoins, p1: inoculation avec la souche non pathogène p1, p3: inoculation avec la souche p3.

Fig. 2 - Effect of the time between preinoculation with ■ non pathogen strain of *V. albo-atrum* p1 and challenge inoculation p3 on flowering (% of tomato plants which had been flowered 11 weeks after inoculation). Preinoculation duration: 0, 30mn, 2, 3, 5 and 7 days. Te: control, p1: inoculation with a non pathogen strain p1, p3: inoculation with a pathogen strain p3.

ches non pathogènes. Les racines des plants témoins sont trempées dans de l'eau stérile. Après traitement par l'agent prémunisant, les plantes sont repiquées en pots de sable et reçoivent 3ml du même inoculum. Après un temps variable, les plantes sont délicatement déterrées de leur pot, puis inoculées de la même manière que précédemment avec une suspension de microconidies (10^6 spores ml) issues de l'isolat p3. Des plantes préinoculées témoins sont trempées dans l'eau stérile. Des plantes témoins prétraitées par l'eau stérile seulement sont trempées dans l'inoculum de l'agent pathogène. Toutes les plantes sont repiquées dans leur pot et reçoivent 3ml de l'inoculum agressif. Les tests sont réalisés sur des lots de 21 plantes.

Le substrat de culture est constitué de sable traité à l'HCl, lavé plusieurs fois à l'eau distillée et stérilisé par la chaleur sèche (24h à 180°C) avant d'être imprégné d'une solution nutritive (Lahlou, 1983). Les cultures sont effectuées dans une chambre à une température de 25 ± 1°C, une humidité relative de 60% et une luminosité de 23 000lux sous une photopériode de 12h. Toutes les plantes sont arrosées tous les 2 jours avec la solution nutritive.

Réisolement du champignon

Des coupes minces de tiges sont déposées dans l'alcool 95° pendant 2 minutes, rincées plusieurs fois à l'eau stérile, séchées rapidement sur un papier absorbant stérile, puis déposées à la surface de boîtes de Pétri contenant un milieu

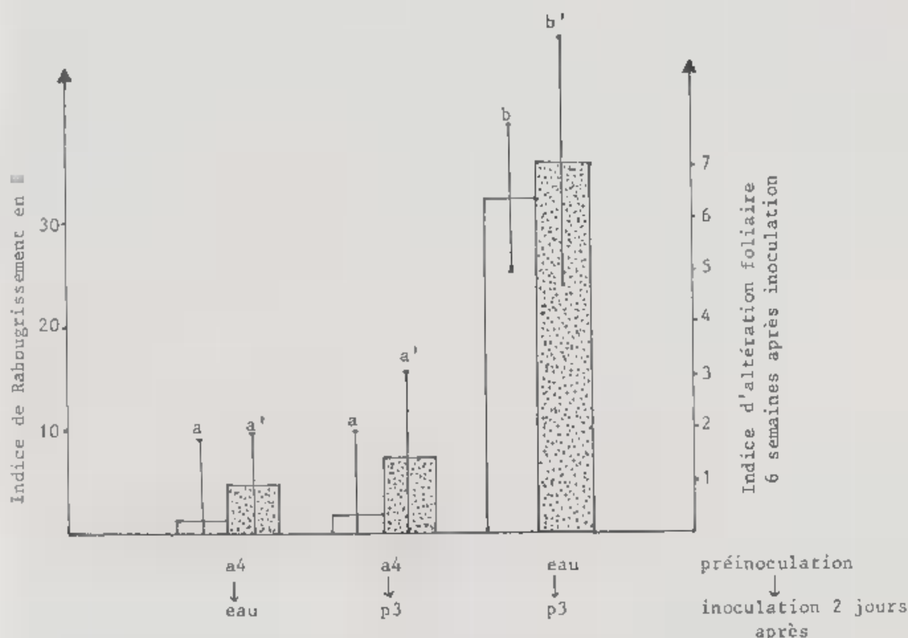


Fig. 3 - Effet de la préinoculation des plantes de tomate avec la souche non pathogène de *V. albo-atrum* a4 (ou eau) sur la croissance (IR) ☐ et les altérations foliaires ▨ des plantes inoculées 2 jours après avec la souche pathogène p3 (ou eau). Deux résultats sont significatifs au seuil 5% s'ils ne sont pas affectés de la même lettre, non significatifs dans le cas contraire.

Fig. 3 - Effect of preinoculation with a non pathogen strain of *V. albo-atrum* a4 (or water) on growth (IR) ☐ and foliar alteration ▨ of tomato plants which had been inoculated 2 days after with a challenger (or water). Letters that are common over the same type of bar are not significantly different, p = 0.05.

P.D.A. additionné d'antibiotiques. En cas de succès, on peut voir au bout d'une semaine un thalle se développer à proximité des fragments de tige.

Analyse minérale

- Teneur des plantes en K^+ et NA^+: les plantes des différents traitements sont arrosées avec la solution nutritive complète. 27 jours après l'inoculation par l'isolat p3, des prélèvements sont effectués (4 répétitions par traitement) en vue d'établir la composition minérale brute en K^+ et Na^+ des organes (racines et tiges).

- Absorption de K^+ et Na^+ par les racines: la préparation des racines en vue de mesurer l'absorption d'ions en 24h a été faite selon la méthode décrite par Guerrier & al. (1985). Les parties aériennes et les racines des plantes sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 24 heures. Après broyage au mortier, la poudre

végétale est pesée et placée dans des creusets de quartz puis mise à calciner à 400°C pendant une nuit. Après refroidissement, les cendres sont récupérées dans 5cc d'un mélange d'acide nitrique 10% et d'acide chlorhydrique 10% et portées à ébullition. Les cendres reprises sont transvasées dans une fiole jaugée qu'on ajuste avec de l'eau bidistillée à 50ml. Le dosage est effectué par absorption atomique après passage au spectrophotomètre Perkin Elmer. Les teneurs en Na^+ et K^+ sont exprimées en gramme pour 100g de matière sèche.

Mesure de l'activité nitrate réductase *"in situ"*

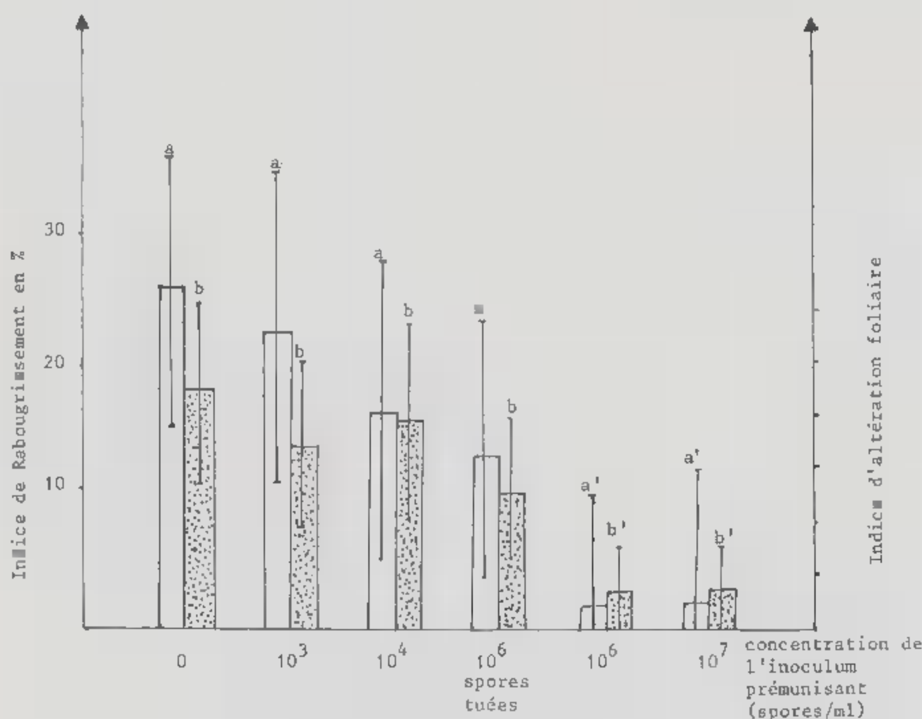


Fig. 4 - Influence de la concentration de l'inoculum prémunisant sur les indices de rabougrissement ☐ et d'altération foliaire ▪ calculés 6 semaines après l'inoculation avec la souche pathogène p3 (10^6 spores/ml) des plantes de tomate différemment prétraitées 2 jours auparavant. Deux résultats sont significatifs au seuil de 5% s'ils ne sont pas affectés de la même lettre, non significatifs dans le cas contraire.

Fig. 4 - Effect of protector inoculum density on dwarfing index ☐ and foliar alteration ▪ (6 weeks after inoculation) of tomato plants which had been pretreated 2 days before challenge inoculation (10^6 spores/ml). Letters are common over the same type of bar are not significantly different, p = 0.05.

27 jours après l'inoculation par l'isolat p3, les plantes sont déterrées et pesées après excision de leurs racines. Elles sont ensuite incubées dans des vénojects de 140ml en anoxie et à l'obscurité (Robin & al., 1983) en présence de KNO_3 100mM (Gojon & al., 1984). Après un temps d'incubation d'1h, le nitrite accumulé est extrait par l'eau bouillante. Des réactifs de diazotation NNEDD (0.2g/l) et de sulfanilamide (10g/l d'HCl) sont additionnés. On laisse la coloration violette se développer pendant au moins 30mn, puis on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 540nm.

Notations des résultats

- Croissance des plantes: la réduction de la taille de l'épicotyle des plantes inoculées par rapport au témoin est estimée par l'indice de rabougrissement IR calculé de la manière suivante:

$$IR = (x_t - x_i / x_t) \times 100,$$

où x_i = accroissement de l'axe aérien du plant inoculé, x_t = accroissement moyen des témoins.

- Indice d'altération foliaire: il exprime l'intensité des altérations foliaires. Une note Ni est attribuée à chaque feuille: 0 = feuille saine, 1 = feuille flétrie sans chlorose, 2 = plages légèrement chlorotiques sur un ou plusieurs folioles, 3 = plages chlorotiques sur toute la surface d'un ou plusieurs folioles ou plages chlorotiques à centre nécrosé, 4 = nécrose totale ou feuille morte. Un indice est établi pour chaque plante:

$$IAF = Ni/4N,$$

où N: nombre total de vraies feuilles.

- Floraison : le nombre de plantes montrant des boutons floraux sur la première inflorescence est noté pour chaque lot de 21 plantes. Il est exprimé en %.

RÉSULTATS

Protection des plantes de tomate par prémunition

- Influence de la durée de préinoculation: nous avons fait varier la durée de la période séparant la préinoculation par l'agent avirulent p1 et l'inoculation par l'isolat p3. Ces durées sont de 0, 30mn, 2, 3, 5 et 7 jours. La croissance des plantes a été suivie durant 6 semaines.

Si l'inoculation par l'isolat p3 suit immédiatement la préinoculation ou si elle a lieu 7 jours après, aucune protection n'est notée (Fig. 1). Pour des durées de préinoculation de 30mn, 3 et 5 jours, l'effet de la protection partielle observée au cours des 4 premières semaines d'observation, diminue progressivement. A la 6ème semaine, les indices de rabougrissement sont aussi prononcés que celui des plantes malades de contrôle. Par contre si l'inoculation par l'isolat p3 a lieu 2 jours après la préinoculation, la protection observée est positive et durable à en juger par les faibles valeurs des indices de rabougrissement et le pourcentage des plantes ayant fleuri en fin d'expérience (Fig. 2).

Tp	réisolement de p1				réisolement de p3				Ti
	plantes inoculées par p1 seul		plantes inoculées par p1 et 2jours après par p3		plantes inoculées par p3 seul		plantes inoculées par p1 et 2jours après par p3		
	base*	apex	base	apex	base	apex	base	apex	
1j	+	-	+	-					
2j	+	-	+	-					
3j	+	-	+	-	+	+	+	-	1j
4j	+	-	+	-	+	+	+	-	2j
6j	+	+	+	+	+	+	+	-	4j
8j	+	+	+	+	+	+	+	-	6j
10j	+	+	+	+	+	+	+	+	8j
12j	+	+	+	+	+	+	+	+	10j

Tabl. 1 - Réisolement des 2 souches de *Verticillium* p1 et p3 dans la base et l'apex des tiges de tomates inoculées. * Niveau du réisolement, − Réisolement positif, - Réisolement négatif, Tp: temps (en jours) après préinoculation par la souche p1, Ti: temps (en jours) après inoculation par la souche p3.

Table 1 - Re-isolation of 2 strains of *Verticillium* p1 and p3 from the base and apex stems of tomato infected plants. * Level of re-isolation, − Positive re-isolation, - Negative re-isolation, Tp: time (days) after preinoculation with p1 strain, Ti: time (days) after inoculation with p3 strain.

Ainsi, le temps optimal de préinoculation est de 2 jours dans les conditions de nos expériences. Ce délai a été retenu pour tester l'effet prémunisant des autres souches hypovirulentes. Avec la souche a4, des résultats positifs ont été obtenus (Fig. 3). Les plantes prémunies ont une croissance semblable à celle des plantes saines. Parfois, nous avons constaté l'apparition tardive de quelques chloroses sur les feuilles de la base et une légère baisse de la croissance des axes aériens, cependant, les indices de rabougrissement et d'altération foliaire restent plus faibles que ceux des plantes malades.

- Influence de la concentration de l'inoculum prémunisant: dans une autre expérience, nous avons fait varier la concentration en conidies de la souche avirulente p1. C'est ainsi que le prétraitement des plantes par des densités d'inoculum inférieures à 10^6 spores/ml n'entraine aucune protection. Les symptômes de la maladie sont aussi sévères que ceux des plantes malades de contrôle (Fig. 4). Pour un inoculum ajusté à 10^6 spores/ml mais dont les spores ont été tuées à la chaleur, les plantes semblent être protégées pendant les 4 premières semaines d'observation, cependant, cette protection s'est révélée transitoire

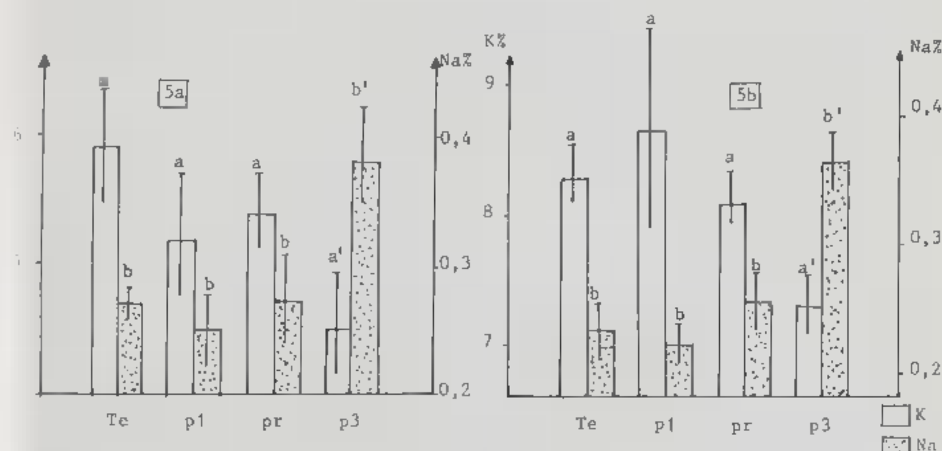


Fig. 5 - Teneur en K⁺ et Na⁺ (27 jours après l'inoculation) des racines (a) et tiges (b) des plantes de tomate cultivées sur solution nutritive complète et différemment traitées. Te: témoin, p1: inoculation avec la souche non pathogène p1 de *Verticillium*, pr: préinoculation avec la souche p1, 2 jours avant l'inoculation par la souche pathogène p3, p3: inoculation avec la souche pathogène p3. Pour un élément donné, les moyennes non accompagnées de la même lettre diffèrent au seuil statistique 5%.

Fig. 5 - Na⁺ and K⁺ contents (27 days after inoculation) in roots (a) and stems (b) of tomato plants grown on a complete nutritive medium and differently treated. Te: control, p1: inoculation with a non pathogen strain p1 of *Verticillium*, pr: preinoculation with p1 strain, 2 days before challenge inoculation, p3: challenge inoculation. For each element, means are significantly different (5%) when they are not accompanied by the same letter.

puisqu'à la 6ème semaine, les plantes ont manifesté un rabougrissement de même importance que celui des plantes malades de contrôle. Il en est de même pour les symptômes foliaires notés à la même période.

Il apparaît donc qu'un nombre suffisant de microconidies vivantes de l'agent prémunisant est nécessaire pour induire la résistance des plantes. Ce taux est approximativement le même que celui de l'agent pathogène.

- Progression du parasite dans les plantes infectées: nous nous sommes demandés si la protection conférée à la plante par l'organisme non pathogène pouvait être l'effet d'une compétition avec l'agent pathogène pour l'occupation physique du milieu représenté par la plante. Pour cela des réisolements réguliers dans le temps, des 2 souches de *Verticillium* p1 et p3 ont été effectués au niveau de l'hypocotyle et du dernier entre noeud des plantes, et ceci pendant 12 jours après préinoculation.

Les résultats (Tab. I) montrent que l'isolat p3 (facilement identifiable puisqu'il forme des microsclérotes après 5 jours de mise en culture) pénètre dans les racines, se localise dans l'hypocotyle, puis migre rapidement dans la tige; il ■ été réisolé de la base et de l'apex des plantes 24h après inoculation.

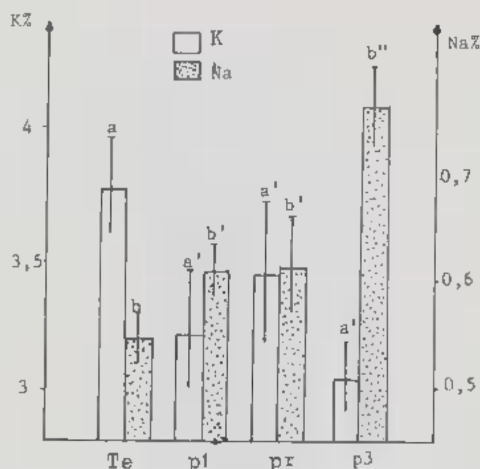


Fig. 6 - Absorption (en 24 h) des ions K^+ et Na^+ par les racines excisées des plantes de tomate cultivées sur milieu $CaSO_4$ et différemment traitées. Te : témoin, p1 : inoculation avec la souche non pathogène p1 de *Verticillium*, pr : préinoculation avec la souche p1, 2 jours avant l'inoculation par la souche pathogène p1, p3 : inoculation avec la souche pathogène p3. Pour un élément donnée, les moyennes non accompagnées de la même lettre différent au seuil statistique 5 %.

Fig. 6 - Daily absorbed amounts of K and Na elements by roots excised from tomato plants grown on a $CaSO_4$ medium and differently inoculated. Te : control, p1 : inoculation with a non pathogen strain p1 of *Verticillium*, pr : preinoculation with p1 strain 2 days before challenge inoculation, p3 : challenge inoculation. For each element, means are significantly different (5 %) when they are not accompagnied by the same letter.

La souche non pathogène p1 pénètre également aussi rapidement que la souche p3 et se maintient dans la racine et la base de l'hypocotyle pendant un certain temps. Elle n'a été réisolée du dernier entre noeud des plantes qu'à partir du 6ème jour après préinoculation.

Dans les plantes prémunies, l'agent non pathogène se trouvant dans la racine n'empêche pas la pénétration de l'agent pathogène. Ce dernier a été réisolé de la base de l'hypocotyle 24h après inoculation, cependant il y reste localisé et n'envahit la totalité de la tige que 8 jours plus tard.

Il apparait donc que les 2 souches de *Verticillium*, pathogène et non pathogène, ne colonisent pas l'ensemble de la plante hôte avec la même vitesse. La présence du parasite non pathogène dans la plante 2 jours avant l'arrivée de l'agent pathogène ne s'oppose pas à l'entrée de l'antagoniste mais semble "retarder" sa progression dans la plante.

Influence de la prémunition sur l'accumulation des ions monovalents chez les plantes infectées

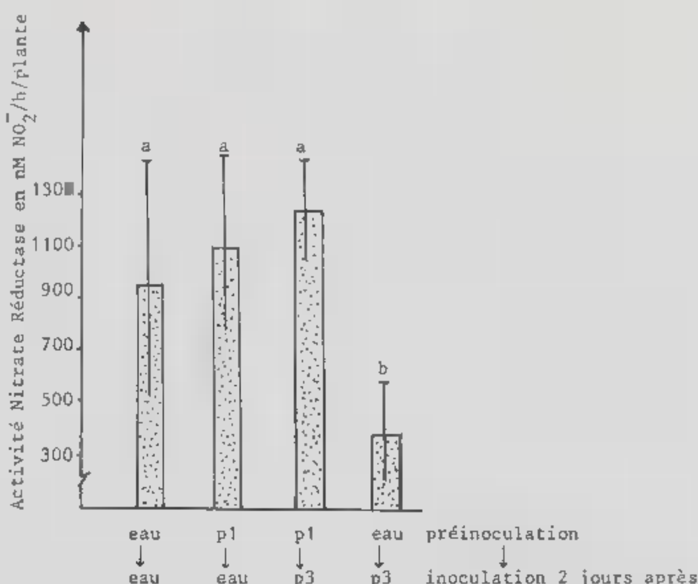


Fig. 7 - Activité nitrate réductase mesurée 27 jours après l'inoculation chez des plantes de tomate préinoculées avec la souche non pathogène p1 de *Verticillium* (ou eau) 2 jours avant l'inoculation avec la souche pathogène p3 (ou eau). Deux résultats sont significatifs au seuil 5% s'ils ne sont pas affectés de la même lettre, non significatifs dans le cas contraire.

Fig. 7 - Nitrate reductase activity (27 days after inoculation) in tomato plants preinoculated with a non pathogen strain of *Verticillium* 2 days before a challenge inoculation (or water). Two results are significant (confidence interval 5%) if they are not affected by any common letter, not significant if they are.

La croissance des plantes protégées par prémunition étant presque semblable à celle des plantes saines, leur nutrition minérale serait-elle affectée par la présence de la souche pathogène de *Verticillium?*

Sur un premier lot de plantes saines, prémunies et malades, nous avons mesuré les teneurs en K^+ et Na^+ des racines et des tiges. Aussi bien dans les tiges que dans les racines, l'inoculation par l'isolat p3 entraîne une baisse dans l'accumulation du K^+, baisse accompagnée par une élévation des teneurs en Na^+ (Fig. 5a-b)). Ces résultats confirment ceux de Guerrier & al. (1985). Chez les plantes prémunies, ces teneurs sont significativement différentes de celles des plantes malades de contrôle. Elles sont statistiquement indistinguibles des teneurs relevées chez les témoins sains ou les témoins inoculés par la souche prémunisante.

Sur un autre lot de plantes arrosées d'une solution de $CaSO_4$, nous avons mesuré l'absorption des ions K^+ et Na^+ en 24h par les racines excisées.

Les résultats (Fig. 6) montrent que l'absorption du K^+ est plus faible chez toutes les plantes inoculées, que ce soit avec une souche pathogène ou non pathogène. A cette baisse correspond une augmentation de l'absorption de Na^+. Toutefois, l'altération observée dans l'absorption de ces deux ions par les racines est moins marquée chez les plantes prémunies.

Influence de la prémunition sur le métabolisme azoté des plantes infectées

L'étude du métabolisme azoté des plantes de tomate a été faite par le biais de l'étude de l'activité de la nitrate réductase (ANR). Cette dernière est représentative du niveau de synthèse des acides aminés et protéines du fait que la nitrate réductase est l'enzyme limitante du processus de réduction des nitrates (Beevers & Hageman, 1969).

Des expériences préliminaires sur l'influence du *Verticillium* sur le métabolisme azoté des plantes de tomate infectées par diverses souches de *Verticillium* ont montré que, dans la capacité de réduire le nitrate, de nettes différences apparaissent entre les plantes inoculées par la souche non pathogène p1 (ANR similaire à celle des témoins) et celles inoculées par la souche pathogène p3 (ANR significativement plus faibles que celles des témoins) (résultats non publiés). Devant cette situation, nous nous sommes demandés si les facultés assimilatrices de l'azote des plantes prémunies seraient épargnées de l'action inhibitrice de l'agent pathogène à l'intérieur des plantes.

Nous avons mesuré l'ANR sur le même lot de plantes ayant servi à l'analyse minérale des différents organes. Des prélèvements ont été faits 27 jours après inoculation. Les résultats consignés sur la Fig. 7 montrent qu'à ce stade la diminution de l'activité assimilatrice de l'azote est assez nette chez les plantes inoculées par l'isolat p3 et manifestant déjà le jour de la manipulation un rabougrissement de 32%. Par contre, les plantes prémunies, de croissance à peu près normale, présentent des ANR semblables à celles des plantes saines.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces résultats démontrent qu'il est possible dans les conditions de nos expériences de prémunir les plantes de tomate var. Marmande contre la verticilliose causée par *V. albo-atrum*, en les préinoculant avec des souches non pathogènes du même champignon.

Le succès du phénomène se manifeste durant les 2 premiers mois après la mise en culture, observation faite aussi par Matta & Garibaldi (1977) et, malgré l'apparition tardive de quelques symptômes de la maladie, les plantes prémunies fleurissent en même temps que les plantes saines.

La protection observée dépend du temps de préinoculation: un délai est nécessaire entre la préinoculation et l'inoculation. Dans le cas de la prémunition contre les verticillioses, ce délai dépend du couple hôte - *Verticillium*. Il est de 7 jours pour la prémunition du coton (Schnathorst & Mathre, 1966), 5 à 9 jours pour la protection de la menthe (Mellouk & Horner, 1975). Dans les conditions de nos expériences ce délai est de 2 jours. Ce résultat est à rapprocher de celui de Wymore & Baker (1982). Ces auteurs ont constaté la nécessité du même délai

pour contrôler la fusariose de la tomate. La préinoculation par l'agent non pathogène semble "activer" les mécanismes de défense de la plante (phytoaléxine ·t autres produits antifongiques...). Leur efficacité semble exiger un délai entre ·ur mise en route et l'arrivée de l'agent pathogène. Ces mécanismes peuvent être ollicités par des facteurs abiotiques tel le stress dû à la chaleur: l'immersion des acines de tomate dans l'eau chaude à 50°C pendant 60 à 90 secondes 2 jours vant l'inoculation par le *Fusarium oxysporum*, a permis de retarder les symptô-ıes de la fusariose (Anchisi & al., 1985).

Une bonne prémunition est liée à une concentration suffisante en icroconidies de l'agent inducteur. Une corrélation positive semble exister entre densité en microconidies et l'activation des mécanismes de défense de la plan-. Ceci est à rapprocher de l'hypothèse de Mas & Molot (1977); une densité uil des spores de l'agent non pathogène est essentielle pour induire les écanismes de résistance des plantes de melon contre le *F. oxysporum*.

La recherche du champignon dans la tige à différents niveaux des plantes émunies a permis de montrer que la protection n'est pas due à une mpétition physique entre les 2 souches de *Verticillium*, mais qu'elle semble due partie au ralentissement constaté dans la colonisation de la totalité de la tige s plantes prémunies par la souche pathogène. Néanmoins, le champignon thogène demeure présent dans les différentes parties des plantes prémunies isqu'il a été réisolé en fin d'expérience.

Les effets du *Verticillium* sur la nutrition minérale et azotée des plantes de to-ate infectées par la souche pathogène p3 s'expriment d'une part, par une baisse ns l'accumulation du K^+ dans les parties aériennes et les racines et d'une usse dans l'accumulation du Na^+, et d'autre part, par une inhibition de ctivité de la nitrate réductase. Les mécanismes "déclenchés" par la prémunition mblent protéger les plantes de tomate de ces actions néfastes. Ils pourraient, tre autres, agir au niveau de:

- la perméabilité membranaire vis-à-vis du K^+ et Na^+, en la préservant de ction des toxines ou enzymes libérées par la souche pathogène, et assurer à la ante un transport normal de son flux xylémique.

- l'enzyme de l'assimilation de l'azote, éventuellement en empêchant sa sactivation par l'agent pathogène et/ou en lui assurant la fourniture du pouvoir ducteur, sachant que la nitrate réductase de la majorité des plantes supérieures ilise spécifiquement le NADH comme cofacteur (Beevers & Hageman, 1969; hrader & al., 1968).

La résistance totale ou partielle acquise par prémunition dépendrait de la ba-nce métabolique délicate qui existerait entre le parasite produisant des étabolites toxiques et l'hôte mettant en oeuvre ses facteurs de résistance.

REMERCIEMENTS : les auteurs remercient M. le Professeur Chevaugeon pour ses nombreux avis et conseils dans la préparation et la réalisation du texte.

BIBLIOGRAPHIE

ANCHISI M., GENNARI M. and MATTA A., 1985 - Retardation of *Fusarium* symptoms in tomato by pre- and post- inoculation treatment of the roots and aerial part of the host in hot water. *Physiol. Pl. Pathol.* 26: 175-183.

BEEVERS L. and HAGEMAN R.H., 1989 - Nitrate reduction in high plants. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 20: 495-522.

DAVID D., 1968 - Partial control of *Fusarium* Wilt in tomato by formae of *F. oxysporum*. *Phytopathology* 58: 121-122.

DOUIRA A. et LAHLOU H., 1989 - Variabilité de la spécificité parasitaire du *Verticillium albo-atrum* Reinke et Bertold, forme à microsclérotes. *Cryptogamie, Mycol.* 10: 19-32.

GOJON A., SOUSSANA J.F., PASSAMA L. et ROBIN P., 1984 - Validité d'une mesure "in situ" pour l'estimation de la réduction de nitrate par des plantes entières de maïs (*Zea mays* L.). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Sér. III, 297: 617-620.

GUERRIER G., LAHLOU H. et BOISSON C., 1985 - Modifications de l'accumulation en Na^{+}, K^{+} et Ca^{++} chez les jeunes plantes de tomate infectées par différentes souches de *Verticillium albo-atrum*. *Pl. & Soil* 84: 11-22.

KUC J., SHOCKLEY G. et KEARNEY K., 1975 - Protection of Cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Pl. Pathol.* 7: 195-199.

LAHLOU H., 1983 - Variabilité intraclonale de la morphologie et du pouvoir pathogène du *Verticillium albo-atrum* R. et B., forme à microsclérotes. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Med V, Maroc.

MAROIS J.J., 1982 - Biological control of *Verticillium* Wilt of Eggplant in field. *Pl. Disease* 66: 1166-1168.

MAS P.M. et MOLOT P.M., 1977 - Influence de la concentration de l'inoculum en microconidies sur la prémunition du Melon contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Ann. Phytopathol.* 9: 71-75.

MATTA A. and GARIBALDI A., 1977 - Control of *Verticillium* of tomato by preinoculation with avirulent Fungi. *Netherlands J. Pl. Pathol.* 83 (suppl.1): 457-462.

MELLOUK H.A. and HORNER C.E., 1975 - Cross protection in mints by *Verticillium nigrescens* against *V. dahliae*. *Phytopathology* 65: 767-769.

ROBIN P., CONEJERO G., TRANCHANT J.P., PASSAMA L. et SALSAC L., 1983 - Mesure de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol. Vég.* 21: 123-128.

SCHNATHORST W.C. and MATHRE D.E., 1966 - Cross protection in cotton with strains of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 56: 1204-1209.

SCHRADER L.E., RITENOUR G.L., EILRICH G.L. and HAGEMAN R.H., 1968 - Some characteristics of NR from higher plants. *Pl. Physiol.* 43: 930-940.

WYMORE L.A. and BAKER R., 1982 - Factors affecting cross protection in control of *Fusarium* Wilt of tomato. *Pl. Disease* 66: 908-910.

BIOSYNTHÈSE DE LA MÉLANINE CHEZ *SORDARIA MACROSPORA*

M.L. BOUILLANT, P. GROUT, J. BERNILLON, J. FAVRE-BONVIN, N. SALIN et N. ARPIN

Laboratoire de Mycochimie (UA CNRS 1127) I.C.B.M.C., Université Claude Bernard Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex

RÉSUMÉ - La voie de biosynthèse de la mélanine chez *Sordaria macrospora* a été établie par l'identification des métabolites précurseurs excrétés d'une part dans le milieu de culture du champignon traité par un inhibiteur de mélanogenèse, le tricyclazole, et d'autre part dans celui de souches mutantes altérées dans leur pigmentation. Ces métabolites, de nature pentacétylique, caractérisent une voie de mélanogenèse découverte chez d'autres Ascomycètes et qui s'effectue par polymérisation du dihydroxy-1,8 naphtalène (DHN).

ABSTRACT - Melanin biosynthetical pathway in *Sordaria macrospora* has been established using precursor metabolites identification. These substances were isolated both from the culture medium of the fungus treated with a melanogenesis inhibitor, such as tricyclazole, and from that of mutant strains altered in their pigmentation. These metabolites are pentaketides and characterise a melanogenetic pathways found in some other Ascomycetes and achieved by 1,8-dihydroxy naphthalene (DHN) polymerization.

MOTS CLÉS : *Sordaria macrospora*, Ascomycètes, biosynthèse, mélanine, dihydroxy-1,8 naphtalène.

INTRODUCTION

Les recherches récentes entreprises sur les voies de mélanogenèse fongique s'expliquent par le rôle que peut jouer la mélanine dans la pathogénicité des espèces: elle sert de protection, vis-à-vis d'agents du milieu (biotiques ou abiotiques), pour les organes de conservation (sclérotes, chlamydospores), mais, surtout, sa présence paraît importante pour la pénétration de la plante par certains parasites. Ainsi, chez des pathogènes comme *Pyricularia oryzae* ou *Colletotrichum lagenarium*, ce sont des appressoriums, structures auxquelles la mélanine confère la rigidité, qui serviront à envahir l'hôte.

En empêchant la mélanogenèse, on diminue donc considérablement la capacité d'envahissement de l'hôte par le parasite. Ainsi, des inhibiteurs chimiques de mélanogenèse appelés antipénétrants, tel que le tricyclazole, sont utilisés

pour lutter contre la pyriculariose. On comprend donc bien, dès lors, l'intérêt porté ces dernières années aux processus de mélanogenèse.

Divers travaux, récapitulés dans la mise au point exhaustive de Bell & Wheeler (1986), ont permis de montrer qu'il existait, chez les champignons, plusieurs voies de biosynthèse des mélanines, originales et spécifiques:

* voie du γ -glutaminyl-1 dihydroxy-3,4 benzène (GDHB),
* voie du catéchol,
* voie des polyacétates *via* le dihydroxy-1,8 naphtalène (DHN).

La voie de biosynthèse animale (polycondensation oxydative de la dihydroxy phénylalanine-DOPA-) n'a pas été démontrée, jusqu'ici, chez les champignons.

La voie qui nous intéresse ici, celle du DHN, semble être particulière aux Ascomycètes. Elle fut mise en évidence chez *Verticillium dahliae* par Bell & al. (1976a, b) et Stipanovic & Bell (1977) en utilisant des mutants déficients en mélanine. Les principaux précurseurs de la voie ont été déterminés: scytalone, trihydroxy-1,3,8 naphtalène, vermélone, dihydroxy-1,8 naphtalène, de même qu'un certain nombre de produits de dérivation également présents dans le milieu de culture (Fig. 1). Toutes ces molécules sont issues d'une première condensation polyacétylique (5 molécules d'acétate) et, à la suite de plusieurs réductions et déshydratations, conduisent au DHN, monomère présumé de la mélanine. Les mutations altérant la mélanisation concernent en général deux activités enzymatiques spécifiques de la voie, à savoir les déshydratases ou les réductases. Le tricyclazole est un inhibiteur spécifique de cette voie. Ses sites d'action sont localisés, selon Tokousbalides & Sisler (1979) et Woloshuk & al. (1980), au niveau des activités réductases. C'est d'ailleurs une étude d'activité de cette molécule sur plusieurs espèces (Wheeler, 1983) qui a permis de soupçonner l'existence de la voie du DHN chez de nombreux Ascomycètes et Deutéromycètes. Cependant, le nombre d'espèces chez lesquelles la voie a été bien étudiée demeure restreint.

A la suite de l'observation (Leblon, comm. pers.) de la décoloration du mycélium de *Sordaria macrospora* par le tricyclazole, nous avons entrepris l'étude de la mélanogenèse de ce champignon, dont nous avons précédemment étudié les conditions de fructification (Roure & Bouillant, 1986). Cet Ascomycète présente une reproduction sexuée de type homothallique, au cours de laquelle la mélanisation rythme les différenciations successives - mélanisation des hyphes qui donnent naissance à des périthèces blancs devenant noirs, à l'intérieur desquels se forment des ascospores noires -. Pour cette recherche, nous disposions, en outre, de plusieurs souches mutantes, altérées dans leur pigmentation, isolées, et bien caractérisées génétiquement, par Zickler & al. (1984).

D'après les résultats que nous avons déjà obtenus en recherchant les métabolites excrétés par cette espèce (Bouillant & al., 1988), il semble que la voie des polyacétates soit très active chez *Sordaria macrospora*. En effet, plusieurs molécules nouvelles (Fig. 2), formées par condensation polyacétylique (6 molécules d'acétate), ont été identifiées; parmi celles-ci, le sordarial et son produit de réduction le sordariol. Des substances analogues existent chez *Pyricularia oryzae*; l'une d'elles, le pyriculol, (Iwasaki & al., 1969, 1973) phytotoxique, est considérée comme en partie responsable de la pyriculariose.

Ces analogies biochimiques font de *Sordaria macrospora*, bien que non phytopathogène, un modèle biologique tout à fait propice pour étudier non seulement les précurseurs des mélanines, mais également la production de polyacétates éventuellement phytotoxiques.

Par le présent travail, nous avons confirmé la voie de biosynthèse de la mélanine chez *S. macrospora* en étudiant les métabolites libérés dans le milieu de culture:

- par la souche sauvage traitée avec du tricyclazole,

- par différents mutants altérés dans leur pigmentation, comparativement à ceux produits par la souche sauvage non traitée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Souches

La souche sauvage et les 3 souches mutantes de *Sordaria macrospora* (Auersw.) nous ont été données par G. Leblon (Laboratoire des Interactions Moléculaires Génomiques, Université Paris-Sud, Orsay). N° de souche (mutation): 2716(B15), 1901(B12), 2144(J14).

Milieu et Conditions de Culture

Le milieu utilisé est préparé à partir des solutions mères suivantes: I.KH_2PO_4 50g/l, II.K_2HPO_4 60g/l, III. $MgSO_4$ 50g/l, IV. Oligoéléments pour 100ml H_2O: Ac. citrique. 1H_2O 5g; $ZnSO_4$. 7 H_2O 5g; $(NH_4)_2$ $Fe(SO_4)_2$ 1g; $CuSO_4$ 0,25g; $MnSO_4$ 0.05g; H_3BO_3 0,05g; NH_4MoO_4. 2H_2O 0,05g; $CHCl_3$ 1ml, V. Biotine 50mg/l EtOH 50%, VI. Thiamine.HCl 100mg/l H_2O. Pour 1l de milieu on mélange: I, 10ml; II, 10ml; III, 10ml; IV, 0,1ml; V, 0,5ml; VI, 0,5ml; glucose 10g; extrait de levure 3g; H_2O q.s.p. 1000ml. Les milieux solides sont préparés en ajoutant 15g d'agar. Pour l'étude des métabolites, les cultures sont réalisées en milieu liquide: soit en erlens de 250ml contenant 50ml de milieu pour la production et l'isolement des composés excrétés, ainsi que pour le test préliminaire d'inhibition par différentes concentrations de tricyclazole, soit en erlens de 25ml contenant 10ml de milieu pour les études cinétiques. L'incubation a lieu à l'obscurité, à 20-24°C.

Supplémentation par le tricyclazole

Le tricyclazole (méthyl-5' triazolo-1,2,4 [3,4-b] benzothiazole) est ajouté au milieu de culture, en solution acétonique (maximum 20μl par erlen de 25ml, pour limiter la toxicité du solvant), à partir de solutions mères calculées pour obtenir les concentrations finales de 0,1, 0,5, 1, 5 et 10ppm. Les concentrations supérieures nécessitent l'addition d'une plus grande quantité de solvant dont l'effet sur la croissance mycélienne n'est pas négligeable.

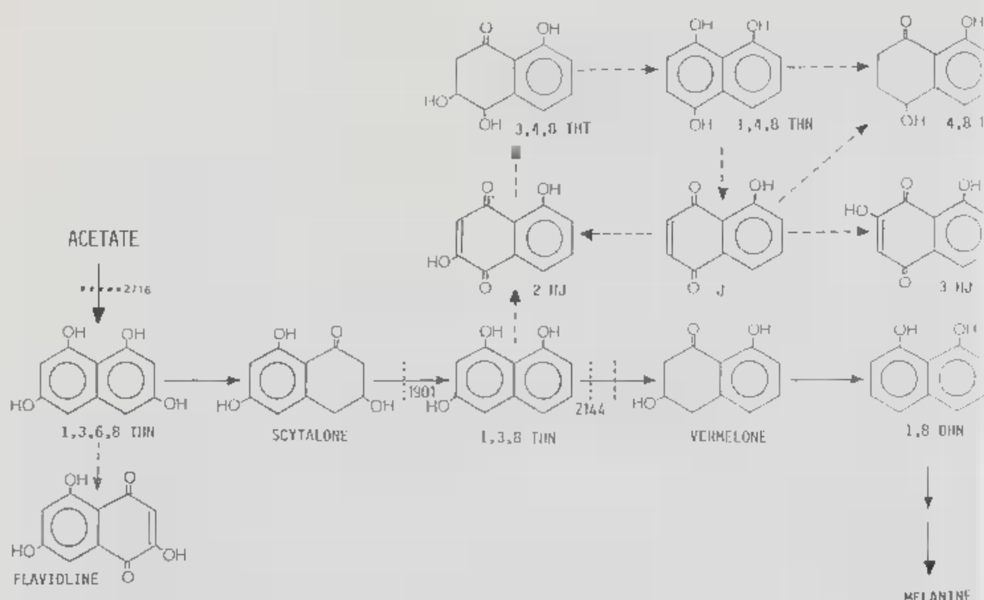


Fig. 1 - Voie de biosynthèse de la DHN mélanine et voies dérivées: site d'inhibition du tricyclazole (----); mutants de *S. macrospora* (.....).

Fig. 1 - Pathway of DHN melanin biosynthesis and branched pathways: site of inhibition by tricyclazole (----); mutants of *S. macrospora* (.....).

Extraction et Isolement des métabolites

Les milieux de culture, après incubation, sont séparés du mycélium par filtration et extraits par l'acétate d'éthyle (2 x 1 vol), ou le n-butanol (1 x 1 vol). Après évaporation des solvants, les résidus secs sont repris par un volume minimal de méthanol. Pour l'isolement des métabolites, les extraits bruts sont fractionnés, d'abord sur colonnes de polyamide acétylé (MN DC_6 Ac) éluées successivement par: hexane, hexane-acétate d'éthyle 1:1, acétate d'éthyle et enfin acétate d'éthyle-méthanol 8:2, ou sur CCM avec centrifugation (Chromatotron) sur gel de silice (60 PF_{254} Merck), dans hexane-acétate d'éthyle-méthanol 6:4:1, ensuite par CLHP préparative (colonne en phase réverse C_{18} Merck, 7μ, Ø 25, L 250mm) ou semi-préparative (id. Ø 0,8mm), en conditions isocratiques. Solvant: acétonitrile - H_2O de 25 à 50%, suivant la polarité des produits. Les études cinétiques sont réalisées à partir de cultures du 2ème au 11ème jour. Le mycélium est pesé, après lyophilisation, et le milieu extrait comme précédemment. Les extraits, en solution méthanolique, sont directement analysés en CLHP: colonne phase réverse Altex, C_{18}, 5μ, Ø 4, L 250mm, gradient de solvants: A/ H_2O + 2% d'acide acétique; B/ acétonitrile-H_2O-acide acétique 75:25:2; 8% de B dans A à 45% de B dans A, en 35mn, 1ml/mn (Greenblatt & Wheeler, 1986). Double détection UV à 254 et 295 nm.

Les composés isolés

Les échantillons témoins: tétrahydroxy-1,3,6,8 naphtalène, trihydroxy-1,3,8 naphtalène, vermélone, hydroxy-2 juglone ont été synthétisés par M. Gaudry (Laboratoire de Chimie Biologique, Université Paris VI), les autres substances ont été isolées et caractérisées dans notre laboratoire à partir de *S. macrospora:* scytalone, par extraction du milieu de culture (5 jours) du mutant 1901, dihydroxy-4,8 tétralone(DHT), par extraction du milieu de culture (5 jours) du mutant 2144.

RÉSULTATS

Étude des métabolites excrétés par la souche sauvage traitée par le tricyclazole

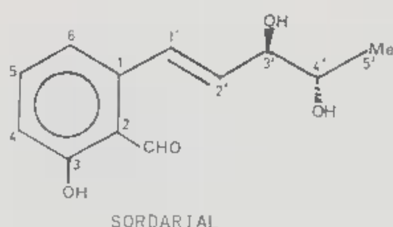
Le fait de traiter *S. macrospora* avec le tricyclazole entraîne une légère décoloration du mycélium, mais surtout une coloration orangée du milieu de culture due à l'accumulation de métabolites excrétés. L'extraction, par l'acétate d'éthyle, de ce milieu de culture à divers temps d'incubation, nous a permis d'identifier par CCM et CLHP comparatives avec des témoins synthétiques:
- le trihydroxy- 1,3,8 naphtalène (1,3,8-THN),
- l'hydroxy-2 juglone (2HJ),
- la dihydroxy-4,8 tétralone-1 (4,8-DHT),
- la flavioline (présente uniquement dans l'extrait butanolique).

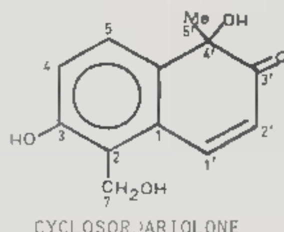
Ces composés ne sont pas excrétés par la souche sauvage non traitée, qui, par contre, accumule les hexaacétates, sordariol, cyclosordariolone et heptacyclosordariolone dont nous avons récemment démontré les structures (Bouillant & al., 1988, 1989).

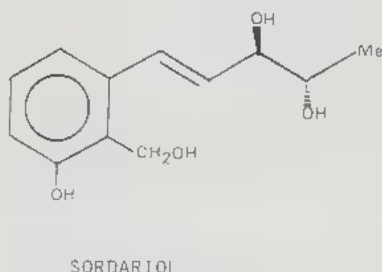
Les cinétiques d'apparition et d'accumulation de ces différents composés (hormis la flavioline) après supplémentation du milieu de culture par différentes concentrations de tricyclazole ont été étudiées. Aux concentrations utilisées (la plus efficace étant 5 ppm), l'accumulation des métabolites de la voie de mélanogenèse commence à l'issue de la croissance exponentielle (au 3ème jour). 1,3,8-THN et 2-HJ ont des maximums de production plus précoces (aux 4ème et 5ème jours) que la 4,8-DHT (7ème et 8ème jours); mais le taux d'accumulation des deux premiers décroît rapidement. Par contre, le dernier demeure présent jusqu'en fin de culture, même lorsque le champignon est traité par des concentrations supérieures à 10 ppm, théoriquement inhibitrices de la formation de ce composé (Tokousbalides & Sisler, 1978).

La comparaison, chez la souche traitée ou non traitée, de l'évolution du poids de matière sèche montre que, de 0,5 à 10 ppm, le tricyclazole n'affecte pas la croissance du champignon. Par contre, la formation des périthèces est retardée. A des concentrations supérieures la croissance est réduite et le retard de développement augmente.

Étude des métabolites excrétés par des souches mutantes altérées dans leur pigmentation







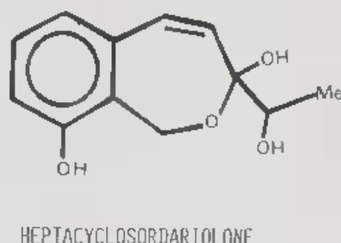


Fig. 2 - Hexacétates de *S. macrospora*.
Fig. 2 - Hexaketides of *S. macrospora*.

- Souche 2144: cette souche excrète dans le milieu de culture de nombreux métabolites qui confèrent à ce dernier une forte coloration orangée. Le mycélium se colore progressivement, pour devenir brun foncé en fin de culture. Dans l'extrait par l'acétate d'éthyle du milieu de culture, nous avons identifié essentiellement: le 1,3,8-THN, la 2-HJ et la 4,8-DHT. L'accumulation des 2 premiers composés est très fugace et n'est vraiment visible qu'aux 4ème et 5ème jour d'incubation. Par contre, la 4,8-DHT, dont l'excrétion est décalée dans le temps par rapport aux composés précédents demeure importante, même en fin de culture.

- Souche 1901: il s'agit d'une souche beaucoup plus claire que la précédente (coloration rose). Elle excrète également de nombreux métabolites dans son milieu de culture (rose-orangé). Après purification et isolement, nous avons identifié comme composé majoritaire, la scytalone, premier intermédiaire connu de la voie du DHN. La flavioline est présente dans l'extrait butanolique. Aucun autre dérivé connu de la voie de mélanogenèse n'a été mis en évidence dans cette souche; par contre, les substances de la voie sordariol sont largement représentées et parmi elles, le sordarial, aldéhyde correspondant au sordariol, abondant ici, alors qu'il n'existe qu'à l'état de trace dans la souche sauvage.

- Souche 2716: cette souche développe un mycélium très clair et un milieu de culture également peu coloré. Aucun des précurseurs mélanogénétiques n'est présent dans les extraits du milieu de culture. Seules les substances de type sordariol (là encore, le sordarial) sont excrétées en abondance.

DISCUSSION

La démonstration de la présence, chez *Sordaria macrospora*, de métabolites tels que la scytalone ou le 1,3,8-THN, soit sous l'action du tricyclazole, soit dans des souches mutantes non mélanisées, permet de conclure que la voie de biogenèse de la mélanine chez cette espèce est bien la voie du DHN. *S. macrospora* se comporte ainsi comme d'autres Ascomycètes.

Parmi les 3 souches mutantes étudiées, la souche 2144 mime l'effet du tricyclazole sur la souche sauvage: un blocage au niveau de la réductase qui transforme le 1,3,8-THN en vermélone. La présence de composé dérivés du 1,3,8-THN confirme ce résultat. Cependant, la coloration foncée prise par le mycélium en fin de culture laisse présager la formation d'autres pigments de type mélanique par une ou des voies dérivées qui pourraient être présentes ou activées lorsque la voie principale est bloquée. Il n'est pas chimiquement impossible que les produits dérivés puissent être eux-mêmes polymérisables en mélanines.

Par contre, les 2 autres souches étudiées ne semblent pas avoir la faculté de synthétiser des pigments bruns. La souche 2716 est une souche albinos qui peut être rapprochée du mutant alm-1 de *Verticillium dahliae*, un blocage précoce empêche la formation de tout précurseur mélanique connu. La souche 1901, qui accumule la scytalone, semble être l'équivalent du mutant brm-1 de *V. dahliae*. Cependant, ce dernier excrète également de la vermélone que nous avons vainement recherchée dans les extraits issus de la souche 1901. Dans ces 2 souches claires, l'accumulation de composés de type sordariol est remarquable, surtout celle du sordarial qui semble prouver l'altération d'une fonction de réduction (celle du groupement aldéhyde).

Les 3 mutants étudiés ont un développement normal, ce qui confirme que, si la mélanogenèse est liée à la fructification, elle ne lui est pas indispensable. Cependant, la survie de tels organismes serait-elle possible ailleurs qu'au laboratoire (voir Arpin & Bouillant, 1988)? A la suite de ce travail, nous envisageons d'étudier d'une part les interactions possibles entre les 2 métabolismes polyacétyliques mis en évidence chez *S. macrospora*, et d'autre part leur éventuelle corrélation au développement sporal. Les composés présents pourraient constituer de bons marqueurs pour une telle recherche.

BIBLIOGRAPHIE

ARPIN N. et BOUILLANT M.L., 1988 - Métabolites secondaires fongiques: diversité de structures mais unité de fonction, la protection. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 267-276.

BELL A.A., STIPANOVIC R.D. and PUHALLA J.E., 1976a - Pentaketides metabolites of *Verticillium dahliae*. Identification of (+) scytalone as a natural precursor to melanin. *Tetrahedron* 32: 1353-1356.

BELL A.A., PUHALLA J.E., TOLMSTOFF W.J. and STIPANOVIC R.D., 1976b - Use of mutants to establish (+) scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Canad. J. Microbiol.* 22: 787-799.

BELL A.A. and WHEELER M.H., 1986 - Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.

BOUILLANT M.L., FAVRE-BONVIN J., SALIN N. and BERNILLON J., 1988 - Sordariol and related compounds, hexaketides in the fungus *S. macrospora*. *Phytochemistry* 27: 1517-1519.

BOUILLANT M.L., BERNILLON J., FAVRE-BONVIN J. and SALIN N., 1989 - New hexaketides related to Sordariol in *Sordaria macrospora*. (à paraître).

IWASAKI S., NOZOE S., OKUDA S., SATO Z. and KOZATA T., 1969 - Isolation and structural elucidation of a phytotoxic substance produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tetrahedron Lett.* n° 45: 3977-3980.

IWASAKI S., MURO H., SASAKI K., NOZOE S. and OKUDA S., 1973 - Isolation of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tetrahedron Lett.* n° 37: 3537-3542.

GREENBLATT G.A. and WHEELER M.H., 1986 - HPLC Analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites. *J. Liquid Chromatogr.* 9: 971-981.

ROURE M. and BOUILLANT M.L., 1986 - Development and application of a bioassay to study the effects of nutrients, pH and active substances on *Sordaria macrospora* fruiting. *Canad. J. Microbiol.* 32: 930-936.

STIPANOVIC R.D. and BELL A.A., 1977 - Pentaketides metabolites of *Verticillium dahliae*. II. Accumulation of naphtol derivatives by the aberrant-melanin mutant brm-2. *Mycologia* 69: 164-172.

TOKOUSBALIDES M.C. and SISLER H.D., 1978 - Effect of Tricyclazole on Growth and Secondary Metabolism in *Pyricularia oryzae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 8: 26-32.

TOKOUSBALIDES M.C. and SISLER H.D., 1979 - Site of inhibition by Tricyclazole in the Melanin Biosynthetic Pathway of *Verticillium dahliae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 11: 64-73.

WHEELER M.H., 1983 - Comparisons of fungal melanins biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81: 29-36.

WOLOSHUK C.P., SISLER H.D., TOKOUSBALIDES M.C. and DUTKY S.R., 1980 - Melanin Biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: site of tricyclazole inhibition and Pathogenicity of Melanin Deficient Mutants. *Pest. Biochem. Physiol.* 14: 256-264.

ZICKLER D., LEBLON G., HAEDENS V., COLLARD A. and THURIAUX P., 1984 - Linkage group chromosomes correlation in *Sordaria macrospora*. Chromosome identification by tridimentional reconstruction of their synaptonemal complex. *Curr. Genet.* 8: 57-67.

KERATINOPHILIC AND CYCLOHEXIMIDE RESISTANT FUNGI IN SOILS OF SINAI GOVERNORATE, EGYPT

A.I.I. ABDEL-HAFEZ*, M.B. MAZEN** and A.A. GALAL*

* Botany Department, Faculty of Science, Sohag, Assiut University, Egypt.
** Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Egypt.

ABSTRACT - Using human hair fragments as baits at 28°C, 44 keratinophilic cycloheximide resistant species and 2 varieties belonging to 16 genera were collected from 100 soil samples gathered from different places of Sinai Governorate (48 from cultivated area, 31 from desert and 21 from salt marshes). Numerous keratinophilic fungi were isolated namely: *Chrysosporium keratinophilum*, *C. tropicum*, *C. indicum*, *C.* state of *Thielavia sepedonium*, *C. asperatum*, *C. merdarium*, *C.* anamorph of *Arthroderma cuniculi*, *C. pannorum*, *C. queenslandicum*, *C. georgii*, *C. luteum*, *C.* state of *Arthroderma tuberculatum*, *Microsporum gypseum*, *M. cookei*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. longifusus*, *T. terrestre*, *Myceliophthora vellerea* and *Candida albicans*. Also several other saprophytic and cycloheximide resistant fungi were isolated.

RÉSUMÉ - 44 espèces de champignons kératinophiles résistant à l'actidione, et 2 variétés (= 16 genres), ont été isolées dans 100 échantillons de sols récoltés en différents lieux du Sinaï (48 sols cultivés, 31 sols désertiques, 21 sols de marais salant), en utilisant comme pièges des cheveux humains. Parmi ces champignons: *Chrysosporium keratinophilum*, *C. tropicum*, *C. indicum*, *C.* anam. de *Thielavia sepedonium*, *C. asperatum*, *C. merdarium*, *C.* anam. d' *Arthroderma cuniculi*, *C. pannorum*, *C. queenslandicum*, *C. georgii*, *C. luteum*, *C.* anam. d' *Arthroderma tuberculatum*, *Microsporum gypseum*, *M. cookei*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. longifusus*, *T. terrestre*, *Myceliophthora vellerea* et *Candida albicans*. Plusieurs autres champignons saprophytes résistant à l'actidione ont également été isolés.

KEY WORDS : keratinophilic fungi, cycloheximide resistant fungi, soil borne fungi.

INTRODUCTION

Studies on keratinophilic fungi are considerable significance and have been reported from soil of many countries all over the world (Ajello & Padhye, 1974; Caretta & al., 1977; Crozier, 1980; Mc Aleer, 1980; Sur & Ghosh, 1980; Calvo

& al., 1984) as well as from air in Italy (Della Franca & Caretta, 1984) and from a small pool (Mangiarotti & Caretta, 1984).

In Egypt, several surveys of these fungi were achieved (Abdel-Fattah & al., 1982; Abou-Gabal & Abd-Elrahiem, 1973; Bagy & Abdel-Hafez, 1985; Bagy, 1986; Moawad, 1969; Mostafa, 1977), but none of these studies were focused on Sinaï soils. The present investigation aims to be an intensive study on the composition and frequency of occurrence of keratinophilic fungi and cycloheximide resistant fungi in soils of Sinai Governorate, Egypt.

The Sinai Peninsula covers an area of 61000km². It is triangular in shape and is separated geographically from Egypt by the Suez Canal and the Gulf of Suez. It is continuous with the Asiatic continent for a distance over 200km long between Rafa on the Mediterranean Sea and the head of the Gulf of Aqaba. The core of the Peninsula, situated near its southern end, consists of an intricate complex of high and very rugged igneous and metamorphic mountains. The northern two-thirds of the Peninsula is occupied by a great northward-draining limestone plateau which rises from the Mediterranean coast, extends southward, and terminates in a high escarpment on the northern flanks of the great igneous core. The central portion of the plateau surface forms a fairly open country draining to the Mediterranean by numerous effluents of Wadi El-Arish. The eastern and western edges of this plateau dissected by numerous narrow and deep rocky valleys draining to the Gulf of Aqaba and Suez. Beyond the northern parts of the peninsula and extending nearly to the Mediterranean coast, is a broad tract of sand dunes some of which attain heights of over 100m above sea level (Said, 1962). In salt marshes area the vegetation are mostly *Anthrocnemon glaucum, Cressa cretica, Halocnemon strobilaceum, Netraria retusa, Salicornia fruticosa* and *Zygophyllum album*. But, in desert locality the plant growth is a thin cover of *Alhagi maurorum, Hyoscyamus muticus, Opuntia retusa, Lygos raetum, Phragmites australis, Punica granatum, Tamarix nilotica* and *Zygophyllum coccineum*.

MATERIALS AND METHODS

One hundred soil samples were collected from different localities of Sinai Governorate representing cultivated area (48 samples), desert (31 samples) and salt marshes (21 samples), according to the method described by Johnson & al. (1959).

The soil samples were analysed chemically for the estimation of total soluble salts, elements (Ca, Mg, K and Na) and organic matter. A pH-meter (WGPYE model 290) was used for the determination of soil pH. The soil type was determined by the hydrometer method as described by Piper (1955) and most of samples are sandy.

Isolation of Keratinophilic Fungi:

The hair baiting technique was employed as recommended by Vanbreuseghem (1952), and as employed by Abdel-Fattah & al. (1982): 100g of soil were put in a sterile plate and a sufficient quantity of sterile distilled water (about 20-25% moisture content) was added and mixed thoroughly. Pieces of sterile human

hair were sprinkled on the surface of the moistened soil. Five plates were used for each sample; the plates were incubated at 28°C for 6-8 weeks, and the soil in plates was remoistened whenever necessary. The moulds which appeared on the baits were transferred to the surface of Sabouraud's dextrose agar medium (Moss & Mc Quown, 1969) which was supplemented with 20 units/ml of sodium penicillin, 40μg/ml of dihydrostreptomycin and 0.05% cycloheximide (Actidione). Before adding to the agar, the first 2 antibiotics were dissolved separately in sterile distilled water while the third was dissolved in methanol. The plates were incubated at 28°C for 3-4 weeks and the developing colonies were examined and identified.

RESULTS AND DISCUSSION

The soil samples tested were generally poor in organic matter content (0.08-2.14% of dry soil) and their contents in total soluble salts widely ranged between 0.1-18.1%, in Ca: 0.01-2.15mg, Mg: 0.01-0.63mg, K: 0.01-0.49mg, and Na: 0.01-2.19mg/g dry soil. Abdel-Fattah (1973) found that the total soluble salts of Egyptian desert soils varies between 0.4-6.6%. The pH values of the soils tested were all in alkaline side (7.1-8.7), and this is in agreement with the pH values of cultivated soils collected from Delta area and Upper Egypt (Moubasher & Abdel-Hafez, 1978). However, Egyptian desert soils previously examined (Abdel-Fattah, 1973) were around neutrality (6.5-7.4).

Fourty-four keratinophilic and cycloheximide resistant species in addition to 2 varieties which belong to 16 genera were collected from 100 soil samples baited with human hair fragments at 28°C (Tabl. 1).

Chrysosporium was the most common genus, occurring in 69% of the samples. It was represented by 12 species of which *C. keratinophilum* was the most common species and was represented in 32% of the soil samples. *C. keratinophilum* emerged from 6% on children playgrounds sand samples (Bojanovsky & al., 1979): from 13.2% of soil samples in W. Germnay (Meissner & Qadripur, 1983); from 16.9% of soils of the Volcano Etna (Caretta & al.,1977); from 10% of the screened soil samples of swine habitats in U.S.A. (Ajello & al., 1964) and from 14% of soils of Spain (Calvo & al., 1984). In Egypt, this species constituted 0.4% only of the total isolates collected by Mostafa (1977). But Abdel-Fattah & al. (1982) recovered this species from Egyptian soils baited with human (10% of the soil samples tested) and animal (20%) hair.

C. tropicum was the second most frequent fungal species and was encountered in 18% of the soil samples tested. It was dominant species in Italy soils (24.5% of the samples) as recorded by Todaro (1978). It was also represented in 20.8 and 12.4% of the soil samples in Marrakesh and Casablanca (Jana & al., 1979). In India, *C. tropicum* occurred in 18% of the soil samples tested (Sur & Ghosh, 1980); in Galapagos Islands in 5.3% (Ajello & Padhye, 1974); in Chilean Andes in 3.9% (Piontelli & Caretta, 1974); in soil of Volcano Etna, 20.5% (Caretta & al., 1977); and Spain in 24% (Calvo & al., 1984). In Egypt, *C. tropicum* was the most common fungal species recovered by baiting, comprising 36.6% of the total fungal isolates (Mostafa, 1977). Moawad (1969) obtained this species only from soil samples taken from El-Fayum Governorate. No other chrysosporia were iso-

lated by him. Abdel-Fattah & al. (1982) isolated *C. tropicum* in 18.5 and 11.4% of the soil samples collected from Assiut Governorate and baited with human and animal hair, respectively.

Table 1: numbers of cases of isolation, percentage frequencies and occurrence remarks of fungal genera and species recovered from soils baited with human hair and incubated at 28°C.

Tableau 1: genres et espèces de champignons isolés à partir de sols, en utilisant comme pièges des cheveux humains. Incubation à 28°C.

Genera and species	NCI and % F	OR
Chrysosporium	69	H
C. keratinophilum (Frey) Carmichael	32	M
C. tropicum Carmichael	18	L
C. indicum	17	L
C. state of *Thielavia sepedonium* Emmons	15	L
C. asperatum Carmichael	8	R
C. merdarium (Link ex Grev.) Carmichael	7	R
C. anamorph of *Arthroderma cuniculi* Dawson	6	R
C. pannorum (Link) Hughes	4	R
C. queenslandicum Apinis & Rees	4	R
C. georgii (Varsavsky & Ajello) Van Oorschot	3	R
C. luteum Constantin	3	R
C. state of *Arthroderma tuberculatum* Kuehn	2	R
Aspergillus	37	M
A. flavus Link	14	L
A. rugulosus Thom & Raper	12	R
A. nidulans (Eidam) Wint.	10	R
A. fumigatus Fresenius	7	R
A. nidulans var. *dentatus* Sandhu & Sandhu	5	R
A. tamarii Kita	4	R
A. nidulans var. *latus* Thom & Church	2	R
A. terreus Thom	2	R
A. versicolor (Vuill.) Tirab.	2	R
A. sydowi (Bain. & Sart) Thom & Church	1	R
Chaetomium	21	L
C. globosum Kunze ex Fr.	13	L
C. olivaceum Cooke & Ellis	9	R
C. trigonosporum (Marchal) Chivers	2	R
Microsporum	13	L
M. gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis	12	R
M. cookei Ajello	1	R
Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.) Bainier	12	R
Trichophyton	10	R
T. mentagrophytes (Robin) Blanchard	6	R
T. longifusus (Florian & Galgoczy) Ajello	4	R
T. terrestre Durie & Frey	1	R
Fusarium	9	R
F. solani (Mart.) Sacc.	6	R
F. acuminatum Ellis & Everhart	2	R
F. oxysporum Schlecht.	1	R
Acremonium	6	R

A. rutilum W. Gams	5	R
A. furcatum F. & V. Moreau ex W. Gams	3	R
Penicillium	6	R
P. nigricans (Bainier) Thom	3	R
P. funiculosum Thom	2	R
P. variabile Sopp	1	R
Sepedonium chrysospermum (Bull.) Link	5	R
Geotrichum candidum Link	3	R
Myceliophthora vellerea (Sacc. & Speg.) Van Oorschot	3	R
Candida albicans (Robin) Berkhout	1	R
Cunninghamella elegans Lender	1	R
Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson	1	R
Syncephalastrum racemosum (Cohn) Schroeter	1	R

NCI: number of cases of isolation (out of 100 soil samples). %F: percentage frequency of occurrence (calculated per 100 samples). OR: occurrence remarks: H: high occurrence, isolated more than 49 cases (out of 100 soil samples), M: moderate occurrence, from 25 to 49 cases, L: low occurrence, from 13 to 24 cases, R: rare occurrence, less than 13 cases.

C. indicum was the third most frequent fungal species and was represented in 17% of the soil samples, whereas it was the most frequent species in cultivated soils collected from Upper Egypt (Abdel-Fattah & al., 1982), but it was less frequent in Egyptian soils tested by Mostafa (1977), as well as from wild sparrow feather and nest (Khalil, 1982). In India, it emerged from 31.3% of the soil samples (Sur & Ghosh, 1980); in mountainous localities in the Chilean Andes, from 19.8% (Piontelli & Caretta, 1974); in Galapagos Islands from 2.6% (Ajello & Padhye, 1974); and Spain, from 4% (Calvo & al., 1984) of the soil samples tested.

Chrysosporium state of *Thielavia sepedonium* was emerged in 15% of the samples tested. Bagy & Abdel-Hafez (1985) isolated the previous species from 5 and 8% of the samples of camel and goat hairs, respectively. *C. asperatum, C. merdarium, C.* anamorph of *Arthroderma cuniculi, C. pannorum, C. queenslandicum, C. georgii, C. luteum* and *C.* state of *Arthroderma tuberculatum* were recovered in rare frequency.

Aspergillus was the second most frequent genus and was encountered in 37% of the samples tested. From the genus 8 species and 2 varieties were collected of which *A. flavus, A. rugulosus, A. nidulans* and *A. fumigatus* were the most common. The remaining *Aspergillus* species were scarcely recovered and these were *A. nidulans* var. *dentatus, A. tamarii, A. nidulans* var. *latus, A. terreus, A. versicolor* and *A. sydowi*. Aspergillosis due to *A. fumigatus* and *A. flavus* has a world-wide distribution (Frey & al., 1979). *A. flavus, A. fumigatus* and *A. nidulans* were present in cases of onychomycosis in Colombia (Velez & Diaz, 1985); *A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans* and *A. sydowi* from hair of large mammals in Egypt (Bagy, 1986); and *A. candidus, A. sydowi, A. terreus* and *A. versicolor* were isolated from nails by English & Atkinson (1974).

Chaetomium occupied the third place with regard to the number of cases of isolation of fungal genera and it recovered from 21% of the samples examined. Three species of *Chaetomium* were isolated and these were *C. globosum* (13%), *C. olivaceum* (9%) and *C. trigonosporum* (2%). Guarro & al. (1981) isolated *C.*

CALVO A., VIDAL M. and GUARRO J., 1984 - Keratinophilic fungi from urban soils of Barcelona, Spain. *Mycopathologia* 85: 145-147.

CARETTA G., FRAT G. Del, PIONTELLI E. and TODARO F., 1977 - Distribution of keratinophilic fungi in the soil of Volcano Etna (Sicily). *Rivista Parassitol.* 38: 115-127.

CROZIER W.J., 1980 - The prevalence of geophilic dermatophytes in soils of the Illawarra area of new South Wales. *Austral. J. Dermatol.* 21: 89-95.

DELLA FRANCA P. and CARETTA G., 1984 - Keratinophilic fungi isolated from the air at Pavia. *Mycopathologia* 85: 65-68.

DISALVO A.F. and FICKLING A.M., 1980 - A case of nondermatophytic toe onychomycosis caused by *F. oxysporum*. *Arch. Dermatol.* 116: 699-700.

DOMINIK T. and MAJCHROWICZ I., 1970 - Further contribution to the knowledge of keratinolytic and keratinophilic fungi of the region of Szczecin, keratinolytic and keratinophilic fungi in excrement of farm animals. *Ekol. Polska* 18: 571-611.

ENGLISH M.P. and ATKINSON R., 1974 - Onychomycosis in elderly chirbody patients. *Brit. J. Dermatol.* 91: 67-72.

FLEMING W.A., 1975 - Dermatophytes isolation in Northern Ireland 1967-1973. *Ulster Med. J.* 44: 44-47.

FRAGNER P. and BELSAN I., 1975 - *Scopulariopsis* Bainier as causative agent of onychomycosis (Mycological and clinical study). *Acta Univ. Carol. Med.* 20: 333-358.

FREY D., OLDFIELD R.J. and BRIDGER R.C., 1979 - *A colour Atlas of pathogenic fungi*. London, Wolfe Medical Publ.

GUARRO J., PUNSOLA L. and CALVO M.A., 1981 - Keratinophylic fungi from soil of Tarragona, Catalunya. *Mycopathologia* 76: 69-61.

JANA M., KURES L., GUESSOUS N., BIAVA M.F. and PERCEBOIS G., 1979 - Keratinophilic micromycetes isolated from various sites in Marrakesh and Casablanca (Morocco). *Bull. Soc. Franç. Mycol. Med.* 8: 225-257.

JOHNSON L.F., CURL E.A., BOND J.H. and FRIBOURG H.A., 1959 - *Method for studying soil microflora-plant disease relationships*. Minneapolis, Burgess Publ. Co.

KHALIL M.M., 1982 - Some ecological and physiological studies on keratinolytic fungi associated with birds in Egypt. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.

MANGIAROTTI A.M. and CARETTA G., 1984 - Keratinophilic fungi isolated from a small pool. *Mycopathologia* 85: 9-11.

Mc ALEER R.R., 1980 - Investigation of keratinophilic fungi from soils in Western Australia. A preliminary survey. *Mycopathologia* 72: 155-165.

Mc GAUGHEY C., COORY C., SENEVIRATIA P. and GEORGE C., 1961 - *Scopulariopsis* in dogs in Ceylon. *Ceylon Veterin. J.* 9: 119.

MEISSNER A. and QADRIPUR S.A., 1983 - Occurrence of keratinophilic fungi in soil from Gottingen. *Mykosen* 26: 61-64.

MOAWAD M.K., 1969 - Study of a different pathogenic fungi isolated from various clinical dermatophytoses. Ph. D. Thesis, Fac. Sci., Cairo Univ.

MOSS E.S. and Mc QUOWN A.L., 1969 - *Atlas of medical mycology*, 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co.

MOSTAFA S.A., 1977 - Studies of certain keratinophilic fungi in ARE soils. M. Sc. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Alexandria Univ.

MOUBASHER A.H. and MOUSTAFA A.F., 1970 - A survey of Egyptian soil fungi with special reference to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Penicillium* related genera. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 54: 35-44.

MOUBASHER A.H., MAZENM.B. and ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1977 - Some ecological studies on Jordanian soil fungi. I. Records of mesophilic fungi. *Naturalia Monspel., Sér. Bot.*, 27: 5-23.

MOUBASHER A.H. and ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1978 - Study on the mycoflora of Egyptian soils. *Mycopathologia* 63: 3-10.

MOUBASHER A.H., ABDEL-FATTAH H.M. and MAGHAZY S.M., 1981 - Effect of treatment of soil with keratinaceous material on soil fungi. *Microbiol. & Immunol.* 25: 853-862.

NAWOK A., 1970 - Keratinolytic and keratinophilic fungi isolated from the soil on which dogs, foxes and minks were bred in the Szczecin region. *Zesz. Nauk. Wyzsz. Szkolg Roln. Szezec.* 32: 217-222.

ONSBERG P., 1980 - *Scopulariopsis brevicaulis* in nails. *Dermatologica* 161: 259-264.

PIONTELLI T. and CARETTA G., 1974 - Ecological consideration in some geomycetes isolated on keratin substrates in mountainous localities in the Chilean Andes. *Rivista Patol. Veg.* 10: 261-314.

PIPER C.S., 1955 - *Soil and plant analysis. A Laboratory manual of methods for the examination of soil and determination of inorganic substituents of plant.* New York, International Publ. Inc.

SAID R., 1962 - *The geology of Egypt.* Amsterdam, New York, Elsevier, 377 p.

SUR B. and GHOSH G.R., 1980 - Keratinophilic fungi from Orissa India. I. Isolation from soils. *Sabouraudia* 18: 275-280.

TODARO F., 1978 - Polluting agent of beaches. Note II. Results of screening in 10 localities on the shore north of Messina (Italy). *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* 29: 491-498.

VANBREUSEGHEM R., 1952 - Biological technique for the isolation of dermatophytes from soil. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 32: 173.

VELEZ H. and DIAZ F., 1985 - Onychomycosis due to saprophytic fungi. *Mycopathologia* 91: 87-92.



Commission paritaire nº 58611
Dépôt légal nº 14734 - Imprimerie de Montligeon
Sortie des presses le 20 septembre 1989
Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : A. Couté; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : R. Baudouin; Directeur de la publication : H. Causse

CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

Les manuscrits doivent être adressés (en 3 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Chaque membre du Bureau se charge d'envoyer l'article à 2 membres du Comité de Lecture (ou autres lecteurs compétants).

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE

Tome 10, 1989

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : ALGOLOGIE, BRYOLOGIE-LICHENOLOGIE, MYCOLOGIE. On peut souscrire indépendamment à chacune des sections.

Abonnement à 1 section :

France	(HT 320 F) 326,72 F
Etranger	HT 350,00 F

Abonnement aux 3 sections :

France	(HT 900 F) 918,90 F
Etranger	HT 980,00 F

Les anciens tomes et fascicules séparés de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOGAMIE : MYCOLOGIE sont toujours disponibles.

MÉMOIRES HORS SÉRIE

Nº 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

Nº 3 (1943). **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

Nº 6 (1958). **Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.

Nº 7 (1959). **Les champignons et nous** (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

Nº 8 (1966). **Catalogue de la Mycothèque de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle** (I) Micromycètes Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

Nº 9 (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 20 F. — (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES

publiée sous la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) (épuisé).

Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941), 164 pages, 46 fig. : 95 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949), 144 pages, 88 fig. : 90 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar, par Marcelle Le Gal (1953), 465 pages, 172 fig. : 150 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965), 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements

- *par virement postal au nom de A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE 12, rue Buffon, 75005 Paris, C.C.P. SCE 34 764 05S*
- *par chèque bancaire établi au même ordre*